



UNIVERSIDAD de BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# Estudio farmacológico de los medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad  
de Buenos Aires en el área Química Biológica

**Lic. Daniela Marisa Rocco**

Director de tesis: **Dr. Facundo García Bournissen**

Consejero de estudios: **Dra. Adalí Pecci**

Lugar de trabajo: Instituto Multidisciplinario de Investigaciones  
en Patologías Pediátricas (IMIPP-CONICET), Hospital de Niños "Dr.  
Ricardo Gutiérrez.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las personas que me acompañaron e hicieron que este camino sea más fácil.

Gracias a mi Director, el Dr. Facundo García Bournissen, por haberme dado la oportunidad de hacer este doctorado y por haber fomentado en mí la curiosidad por la farmacología. Un placer haber compartido estos años de trabajo.

También gracias al Dr. Jaime Altcheh por la posibilidad de realizar mi tesis en el prestigioso Servicio de Parasitología y Chagas del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. Un lugar lleno de gente hermosa con una fuerte vocación.

A mis compas de labo, gracias por la ayuda, por la terapia, por las cervezas, por las risas. Gracias por la amistad.

Gracias a mi familia que es incondicional, que ha creído siempre en mí y me ha apoyado en todo.

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá,  
mi hermana y  
mi papá.

## Pharmacological study of drugs for Chagas disease treatment

Chagas disease is a tropical neglected disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and affects more than 8 million people across the world but specially in Latin America. Treatment involves administration of one of two trypanocidal drugs, benznidazole (currently considered the first line treatment) or nifurtimox. While benznidazole has been shown to be effective and safe, and has been used for almost 50 years, pharmacological knowledge of this drug remains limited, particularly regarding its metabolic pathways, actual metabolites and pharmacokinetics. Since Chagas disease treatment requires long administration periods (i.e., more than 30 days), significant toxicity is common, often leading to treatment suspension; it is extremely crucial to understand benznidazole pharmacokinetics including its metabolism and distribution to understand the mechanisms underlying its toxicities, and to improve treatment regimes. Furthermore, differences in parasite benznidazole metabolism could contribute to understand its mechanisms of action.

In the work contained in this thesis, I present the results of the experiments I performed during my PhD studies, aimed at identifying and describing the main metabolites of benznidazole, some never reported before, in humans and in the parasite. Moreover, we present evidence of *in vitro* hepatic metabolism of benznidazole in several mammalian species.

In order to describe the biodistribution of benznidazole and its metabolites, we have performed a pharmacokinetic study of benznidazole in an acute murine infection model of Chagas disease. The re-

sults show rapid drug absorption and elimination and prove the presence of benznidazole and several of its metabolites in different organs.

We also describe benznidazole metabolism in the parasite, in its infective trypomastigote form, and conclude that one of the main differences between mammalian and trypomastigote metabolism is the production of metabolites that become conjugated with glucuronic acid, which requires enzymes not available in *T. cruzi*.

Finally, the preliminary study of predictive biomarkers of adverse reactions from benznidazole and nifurtimox lay the foundation for future studies, since we have detected some potential biomarkers that will require confirmation, but mainly identified the issues and problems at different steps of the process that should be improved to obtain more accurate and consistent results.

## Estudio farmacológico de los medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una enfermedad tropical desatendida causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* que afecta a más de 8 millones de personas en todo el mundo, especialmente en América Latina. El tratamiento implica la administración de fármacos tripanocidas, benznidazol (considerado el tratamiento de primera línea) o nifurtimox. Si bien se ha demostrado que el benznidazol es eficaz y seguro, y se ha utilizado durante los últimos 50 años, el conocimiento farmacológico de este fármaco sigue siendo limitado, en particular en lo que respecta a sus vías metabólicas, metabolitos y farmacocinética. Dado que el tratamiento requiere períodos de administración prolongados de más de 30 días, suele ser común la aparición de toxicidad significativa que lleva a la suspensión del tratamiento. Es sumamente crucial comprender la farmacocinética del benznidazol, incluido su metabolismo y distribución, para comprender los mecanismos subyacentes a estas toxicidades a fin de mejorar los regímenes de tratamiento. Además, las diferencias con el metabolismo parasitario del benznidazol podrían contribuir a comprender sus mecanismos de acción.

En el trabajo contenido en esta tesis, se presentan los resultados de mis estudios de doctorado, encaminados a identificar y describir los principales metabolitos del benznidazol, algunos nunca reportados previamente, en humanos y en el parásito. Además, se presenta evidencia del metabolismo hepático *in vitro* del benznidazol en varias especies de mamíferos.

Para describir la biodistribución del benznidazol y sus metabolitos, se realizó un estudio farmacocinético del benznidazol en un modelo

de infección aguda murina de la enfermedad de Chagas. Los resultados muestran una rápida absorción y eliminación del fármaco y prueban la presencia de benznidazol y varios de sus metabolitos en diferentes órganos.

En este estudio también se describe el metabolismo del benznidazol en el parásito en fase infecciosa, concluyendo que una de las principales diferencias entre el metabolismo de los mamíferos estudiados y los tripomastigotes es la producción de metabolitos que se conjugan con ácido glucurónico, reacción que requiere enzimas no disponibles en *T. cruzi*.

Finalmente, el estudio preliminar de biomarcadores predictivos de reacciones adversas de benznidazol y nifurtimox sienta las bases para estudios futuros, ya que se detectaron algunos biomarcadores potenciales que requerirán confirmación, pero principalmente se identificaron las principales cuestiones del proceso que aumentarían la variabilidad de los resultados y que deben mejorarse para obtener mayor precisión y consistencia en los mismos.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico  
 ARN: Ácido Ribonucleico  
 BNZ: Benznidazol  
 BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)  
 CID: Disociación Inducida por Colisiones (*Collision Induced Dissociation*)  
 CYPs: Citocromos  
 CYP450: Citocromo P450  
 CPR: Citocromo P450 reductasa  
 DTT: ditiotreitól  
 ELISA: Ensayo Inmuno-adsorbente Ligado a Enzimas (*Enzyme-Linked Immunosorbent assay*)  
 EMS: Espectro de Masas Mejorado (*Enhanced Mass Spectra*)  
 ESI: Ionización por Electrospray (*Electrospray Ionization*)  
 IAM: yodoacetamida  
 IFI: Inmunofluorescencia Indirecta  
 HAI Hemaglutinación Indirecta  
 MS: Espectrometría de Masas (*Mass Spectrometry*)  
 MS/MS: Espectrometría de Masas en tandem  
 MRM: Monitoreo de Reacción Múltiple (*Multiple Reaction Monitoring*)  
 NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato  
 NFX: Nifurtimox  
 NL: Pérdida Neutra (*Neutral Loss*)  
 PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)  
 p-NP: para-Nitrofenol  
 PCR: Reacción de Polimerasa en Cadena (*Polymerase Chain Reaction*)  
 PTFE: Politetrafluoroetileno  
 QqQ: Triple cuadropolo  
 QTOF: Cuadropolo tiempo de vuelo (*Quadrupole Time of Flight*)



SFB: Suero Fetal Bovino

TCA: Ácido Tricloroacético

UDPGA: Ácido uridin-difosfato glucurónico

UHPL: Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*)

UGT: Uridinadifosfato Glucuronil Transferasa

INTRODUCCIÓN .....	15
1. Generalidades de la enfermedad de Chagas .....	16
1.1. Historia .....	16
1.2. Epidemiología .....	17
2. Vías de transmisión .....	19
3. Agente etiológico .....	21
3.1. Generalidades sobre tripanosomátidos .....	21
3.2. Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi .....	21
4. Estadíos clínicos de la infección .....	24
4.1. Etapa aguda .....	24
4.2. Etapa crónica indeterminada y crónica determinada .....	24
5. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas .....	25
6. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas .....	26
6.1. Nifurtimox .....	27
6.2. Benznidazol .....	28
6.3. Reacciones adversas asociados al tratamiento .....	29
7. Aspectos generales sobre farmacología .....	31
7.1. Metabolismo .....	31
7.1.1. Reacciones de Fase I y II .....	33
8. Farmacología de benznidazol .....	35
8.1. Metabolismo .....	36
8.2. Farmacocinética .....	37
9. Metabolismo parasitario de BNZ .....	38

10. Biomarcadores en enfermedad de Chagas .....	39
10.1. Biomarcadores predictores de reacciones adversas .....	40
Objetivo general .....	41
Objetivos .....	41
MATERIALES y MÉTODOS .....	42
1. Materiales .....	43
1.1. Solventes, soluciones tampones, medios de cultivos y reactivos de usos diversos .....	43
1.2. Equipamiento .....	44
2. Métodos .....	44
2.1. Detección de BNZ e identificación de sus principales metabolitos en orina humana .....	44
2.1.1. Recolección y procesamiento de muestras .....	44
2.1.2. Detección y cuantificación de BNZ .....	45
2.1.3. Identificación de los principales metabolitos del BNZ en orina .....	47
2.2. Metabolismo de BNZ en mamíferos, modelo <i>in vitro</i> .....	48
2.2.1. Sacrificio y toma de muestras murinas y porcinas .....	49
2.2.2. Purificación de microsomas hepáticos .....	49
2.2.3. Cuantificación de proteínas en microplaca .....	51
2.2.4. Controles de actividad microsomal .....	51
2.2.4.1. Determinación de actividad de CYP2E1/CYP3A4 .....	51
2.2.4.2. Determinación de actividad de UGT por glucuronización de para-nitrofenol .....	52

2.2.5. Ensayos metabolismo <i>in vitro</i> de BNZ .....	53
2.2.6. Identificación de metabolitos de BNZ .....	54
2.2.7. Ensayo de cinética in vitro de metabolitos de BNZ .....	54
2.3. Modelo murino de farmacocinética poblacional de BNZ .....	55
2.3.1. Infección de ratones .....	55
2.3.2. Parasitemias .....	56
2.3.2. Sacrificio y recolección de muestras .....	56
2.3.2.1. Recolección de muestras de sangre por punción submandibular .....	56
2.3.2.2. Sacrificio y recolección de muestras de sangre .....	57
2.3.2.3. Sacrificio y recolección de muestras de órganos .....	58
2.3.3. Ensayo de farmacocinética .....	58
2.3.4. Procesamiento y extracción de BNZ y sus metabolitos .....	59
2.3.4.1. Muestras sanguíneas .....	59
2.3.4.2. Muestras de órganos .....	59
2.3.5. Cuantificación de BNZ y pseudo cuantificación de sus metabolitos .....	59
2.3.6. Modelo de farmacocinética poblacional .....	60
2.4. Perfil de metabolitos de BNZ producido por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	61
2.4.1. Cultivo de células Vero .....	61
2.4.2. Infección de células Vero con tripomastigotes .....	61
2.4.3. Purificación de tripomastigotes de cultivo .....	62
2.4.4. Ensayo de metabolismo parasitario .....	62

2.4.5. Cuantificación de BNZ y búsquedas dirigidas de metabolitos de BNZ .....	63
2.5. Estudio retrospectivo y exploratorio de biomarcadores predictores de reacciones adversas .....	63
2.5.1. Criterio de selección de muestras .....	64
2.5.2. Colección de muestras .....	66
2.5.3. Análisis de muestras por proteómica .....	66
2.5.3.1. Extracción de muestras en papel .....	66
2.5.3.2. Top-down .....	66
2.5.3.2. Bottom-up .....	68
RESULTADOS .....	70
1. Detección de BNZ e identificación de sus principales metabolitos en orina humana .....	71
1.1. Detección y cuantificación de BNZ .....	71
1.2. Identificación de los principales metabolitos de BNZ .....	73
2. Metabolismo mamífero <i>in vitro</i> .....	86
2.1. Cuantificación de proteínas por método de Bradford en microplaca .....	86
2.2. Controles de actividad microsomal .....	87
2.2.1. Determinación de actividad de CYP2E1/CYP3A4 y UGT .....	87
2.3. Ensayos metabolismo <i>in vitro</i> de BNZ .....	88
2.4. Identificación de metabolitos de BNZ .....	89
2.5. Ensayo de cinética <i>in vitro</i> de metabolitos de BNZ .....	91
3. Modelo murino de farmacocinética poblacional de BNZ .....	93

3.2. Recolección de muestras de sangre por punción submandibular	93
3.3. Cuantificación de BNZ y pseudo cuantificación de metabolitos .....	94
3.3.1. Plasma .....	94
3.3.2. Órganos .....	96
3.4. Modelo de farmacocinética poblacional de un compartimento .	99
4. Perfil de metabolitos de BNZ producido por <i>Trypanosoma cruzi</i>	102
4.1. Cuantificación de BNZ y búsquedas dirigidas de sus metabolitos .....	102
5. Estudio retrospectivo y exploratorio de biomarcadores predictores de reacciones adversas (RA) .....	104
5.1. Top-down .....	104
5.2. Bottom-up .....	111
DISCUSIÓN .....	124
Parte I. Muestras de orina de pacientes con enfermedad de Chagas en tratamiento con BNZ: detección y cuantificación de la droga e identificación de sus metabolitos. ....	126
Parte II. Metabolismo mamífero <i>in vitro</i> de BNZ. ....	130
Parte III. Modelo murino de farmacocinética poblacional de BNZ	135
Parte IV. Metabolismo parasitario <i>in vitro</i> de BNZ. ....	139
Parte V. Estudio retrospectivo y exploratorio de biomarcadores predictores de eventos adversos. ....	140
CONCLUSIÓN .....	144
BIBLIOGRAFÍA .....	147

# INTRODUCCIÓN

## 1. Generalidades de la enfermedad de Chagas

### 1.1. Historia

A principios del siglo XX, durante una campaña antimalárica debida a la construcción de una red ferroviaria en el norte de Brasil, el higienista y bacteriólogo brasilero Carlos Chagas, describió por primera vez tripanosomátidos en el intestino de vinchucas (*Triatoma*) y en honor a su mentor el médico y bacteriólogo Oswaldo Cruz, los denominó *Tripanosoma cruzi*. Hasta ese entonces, se desconocía si el parásito pudiese ser causante de alguna patología humana, a pesar de lograr infectar y detectar parásitos en sangre de diferentes animales de laboratorio. Un año después, en 1909, Carlos Chagas logró asociar el parásito con la patogenia presentada por una paciente de 2 años (Berenice), esto culminaría en el descubrimiento de una nueva enfermedad que posteriormente llevaría su nombre (Chagas C. 1909).

Debido a diferentes razones, la enfermedad de Chagas desde su descubrimiento fue silenciada durante mas de 20 años, (Steverding 2014) hasta la intervención, en la década de 1930, del médico argentino Salvador Mazza quien describió miles de casos en varias provincias argentinas. Una década más tarde se comenzó a llevar a cabo el test diagnóstico serológico que permitió describir la enfermedad en toda Latinoamérica (Steverding 2014).

No fue hasta 1948, que se establecieron los primeros intentos por llevar a cabo el control químico del vector por fumigación domiciliaria, derivando estos esfuerzos en la creación, tanto en Brasil como en Argentina, de programas estatales de control de triatominos (Morel 1999).

En lo que respecta al tratamiento de la enfermedad, tras varios intentos fallidos de hallar drogas eficaces, surgen dos compuestos



nitroheterocíclicos: el benznidazol (BNZ) comercializado por Hoffmann-La Roche a partir de en 1972 bajo el nombre Rochagan® o Radanil® y el nifurtimox (NFX) comercializado por Bayer a partir de 1967 como Lampit® (Jannin and Villa 2007) .

Estos compuestos, que son utilizados hasta la actualidad, son eficaces en la fase aguda de la enfermedad, pero se describen como poco eficaces en la fase crónica.

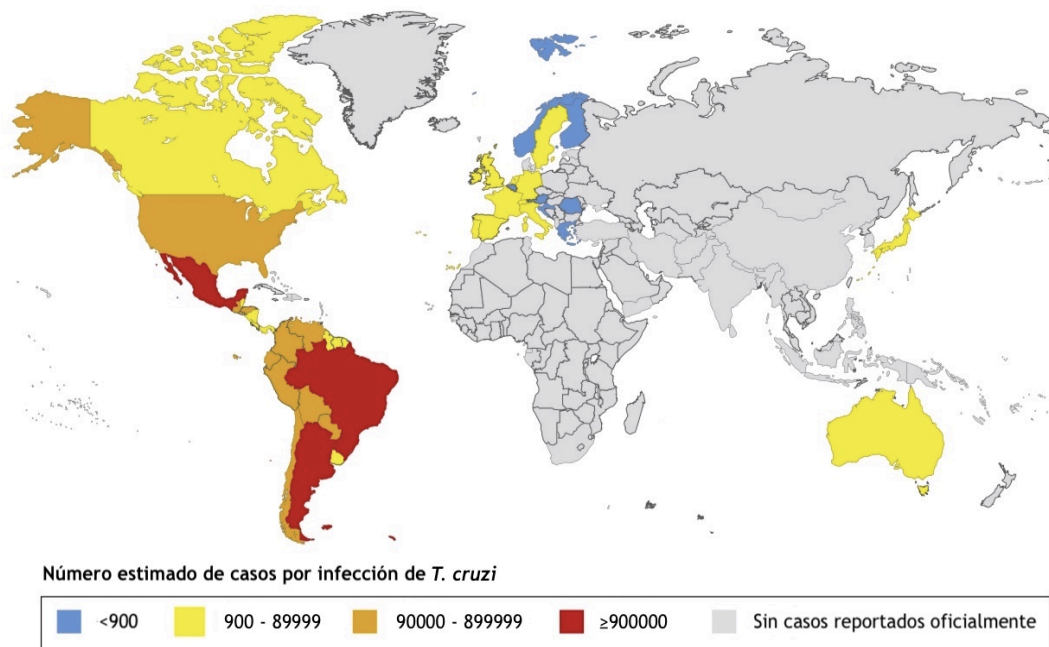
A fines de los '70 y tras la estandarización de las técnicas serológicas y del criterio de diagnóstico, se comenzaron estudios epidemiológicos protocolizados; en paralelo se avanzó en la descripción del ciclo de vida del parásito y en la caracterización bioquímica de cepas, lo que llevó a que conjuntamente con el avance de la biología molecular en los años consecutivos, se comenzase la caracterización molecular del patógeno (Morel 1999).

### **1.2. Epidemiología**

La enfermedad de Chagas, conocida también como tripanosomiasis americana, es potencialmente mortal y constituye un problema de salud pública en América Latina debido a las complicaciones crónicas de salud (puede afectar el corazón, órganos del sistema digestivo y el sistema nervioso) que genera en quien lo padece.

La enfermedad de Chagas es endémica en muchas regiones de Latinoamérica, donde se calcula que hay entre 8 y 11 millones de personas infectadas (CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades) n.d.), las personas que viven en áreas rurales suelen estar expuestas a un mayor riesgo de contraer la infección, dado que los triatomíneos proliferan en casas con muros de barro y techos de paja.

En las últimas décadas también se ha observado con mayor frecuencia la presencia de esta enfermedad en Norteamérica y Europa (WHO World Health Organization 2018), debido a los movimientos migratorios, por lo que el perfil epidemiológico a nivel mundial es el resultado de dos factores: la transmisión vectorial doméstica y los grandes movimientos migratorios de los últimos 50 años (Figura I1). En Argentina, si bien la enfermedad es endémica, la transmisión vectorial puede darse con mayor o menor frecuencia en función de la presencia de vinchucas, habiendo zonas de alto, mediano y bajo riesgo de transmisión y zonas libres de riesgo (Cuba Cuba and Hidalgo n.d.). Según el Programa Nacional de Chagas (2010) se estiman en Argentina, 1.6 millones de personas infectadas.



**Figura I1.** Estimación global de población infectado por *Trypanosoma cruzi*, 2009 (Perez, Lymbery, and Thompson 2015).

En los últimos años, la transmisión vectorial se ha reducido en muchos países de Latinoamérica gracias a iniciativas multinacionales coordinadas por la Organización Panamericana de la Salud (Schofield, Jannin, and Salvatella 2006).

## 2. Vías de transmisión

Existen diversas formas de transmisión de la infección por *T. cruzi*, siendo la vectorial exclusiva de zonas endémicas. Las vinchucas, que son los vectores portadores de los parásitos, son insectos heterópteros hematófagos pertenecientes al género *Triatoma* que, en zonas rurales o áreas suburbanas, viven típicamente en las paredes y grietas del techo de viviendas precarias; permaneciendo inactivas durante el día para volverse activas por la noche. Los reservorios mamíferos son, en el ciclo selvático, principalmente primates, roedores, aves y marsupiales, mientras que en el ciclo doméstico son humanos, perros y gatos (Rassi, Anis Jr; Rassi 2010).

El contagio se produce cuando una vinchuca infectada, que usualmente en humanos pica en áreas expuestas de la piel, al alimentarse defeca heces con parásitos en zonas cercanas a la picadura. Debido a la comezón, es normal que la víctima se rasque esparciendo los parásitos por la picadura, los ojos, la boca o cualquier excoriación de la piel que permitirá el ingreso de los parásitos a cuerpo (WHO World Health Organization 2018).

Distintos factores (económicos, sociales, culturales) favorecen la transmisión vectorial en poblaciones de riesgo, pero fundamentalmente es el rol activo del estado a través de programas de fumigación, entre otras iniciativas, lo que determina el control de este tipo de transmisión. Desde el punto de vista sanitario, ésta es la

forma de transmisión más importante, ya que de ella depende el riesgo de las otras vías de transmisión (Cuba Cuba and Hidalgo n.d.).

Otra vía común de infección es la congénita vertical o transplacentaria, que se produce durante el embarazo a través de la placenta de la madre infectada a su hijo, o en el momento del parto; según la Organización Mundial de la Salud (WHO World Health Organization 2018) hay alrededor de un millón de mujeres infectadas con *T. cruzi*, de entre 15 y 44 años en Latinoamérica, con un riesgo de transmisión congénita de la infección de alrededor del 5% (Howard et al. 2014; Messenger and Bern 2018). El éxito de la transmisión materna-fetal depende de varios factores, en su mayoría desconocidos, aunque se plantea que la cepa parasitaria, el estado inmunológico de la madre, y factores placentarios podrían jugar un rol importante (Carlier and Truyens 2017).

Menos frecuentemente se observa la transmisión oral, o infección por vía digestiva, que ocurre cuando se ingieren alimentos contaminados con materia fecal o con restos de vinchuca infectada, y que ha sido descrita en algunas regiones endémicas (Coura 2015; de Noya et al. 2015; Silva-dos-Santos et al. 2017).

Finalmente se pueden describir las transmisiones por transfusiones de sangre o trasplante de órganos provenientes de donantes infectados. Los movimientos migratorios hacia regiones como Europa y Norteamérica, zonas no endémicas que solían ser libres de riesgo en lo que respecta a este tipo de transmisión, representan una nueva amenaza para el suministro de sangre y trasplante de órganos, con casos reportados (CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades) n.d.; Leiby et al. 1999; Villalba et al. 1992) y requiriendo la implementación de medidas de control más estrictas

(Wendel 2010). Menos frecuentemente, se describen accidentes de laboratorio que pueden derivar en una infección.

### **3. Agente etiológico**

#### **3.1. Generalidades sobre tripanosomátidos**

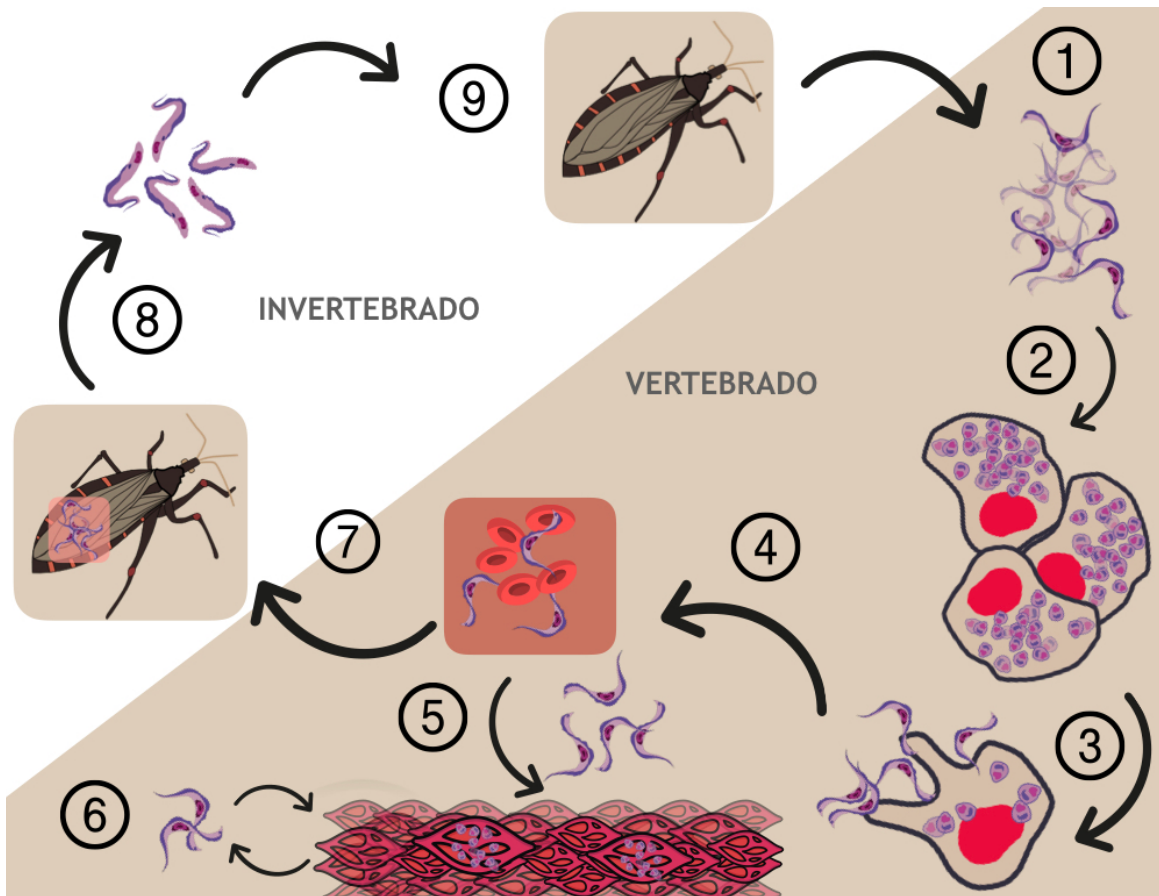
El agente etiológico del Chagas es el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, que pertenece a la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida (Levine et al. 1980). Dentro de esta familia que describe varios géneros, se incluyen especies responsables de otras enfermedades, es el caso del género *Trypanosoma*, que además de incluir a *T. cruzi* también incluye a *T. brucei* causante de la tripanosomiasis africana conocida como enfermedad del sueño.

#### **3.2. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi***

El ciclo biológico del parásito es complejo, presentando tres formas evolutivas con características diferentes a nivel morfológico y metabólico, y dos hospedadores, uno vertebrado y otro invertebrado (vinchuca). En lo que respecta a las tres formas que presenta, se describe: la forma amastigote, sin flagelo libre, que es el estadio intracelular y replicativo en vertebrados, la forma tripomastigote, flagelado, que es infectiva pero no replicativa y se halla tanto en el hospedador vertebrado como en el invertebrado (tripomastigote metacíclico), y finalmente la forma epimastogite replicativa, también flagelado, que solo se encuentra en el intestino del vector. (Figura I2) La fase del ciclo con hospedador invertebrado se inicia cuando el triatomino se infecta al alimentarse de sangre con tripomastigotes circulantes del hospedador. En la vinchuca, los tripomastigotes

mastigotes se diferencian a epimastigotes que posteriormente comenzarán a replicarse para luego, ya en el intestino, diferenciarse a tripomastigotes metacíclicos infectivos que serán excretados con las heces (Brener 1971). En este punto finaliza la fase con hospedador invertebrado para dar inicio a la fase con hospedador vertebrado. Los tripomastigotes metacíclicos ingresan por mucosas intactas o por excoriaciones de la piel y comienzan a invadir diferentes tipos de células con el objetivo de diferenciarse a la forma amastigote y replicarse, por fisión binaria, en el citoplasma durante varios días (Brener 1971).

Pasado este período de tiempo, los amastigotes se transforman en tripomastigotes que, debido al movimiento flagelar, colapsan la estructura de la célula huésped llevando a la ruptura de esta. Estos tripomastigotes, liberados al torrente sanguíneo, tienen la capacidad de invadir nuevas células e iniciar un nuevo ciclo replicativo, además de estar disponibles para infectar vectores que se alimenten del hospedador.



**Figura I2.** Ciclo de vida de *T. cruzi*. El ciclo en el hospedador vertebrado inicia cuando tripomastigotes metacíclicos ingresan al mismo (1) para luego invadir células nucleadas, diferenciarse a la forma intracelular amastigote y posteriormente replicarse (2). Los amastigotes se diferenciarán a tripomastigotes y romperán la célula hospedadora (3), ingresando al torrente sanguíneo y llegando a diversos tejidos en donde invadirán nuevas células (5) o bien continuarán infectando células aledañas (6). Los tripomastigotes circulantes se hallan disponibles para infectar vectores que se alimenten de la sangre del hospedador (7), en este punto del ciclo, comienza la etapa de hospedador invertebrado. En el vector, los tripomastigotes pasan a la forma replicativa epimastigote (8) y una vez en el intestino se diferenciarán a tripomastigotes metacíclicos (9).

## **4. Estadíos clínicos de la infección**

### **4.1. Etapa aguda**

La fase aguda tiene una duración de aproximadamente cuatro semanas y se caracteriza por una elevada parasitemia (presencia de parásitos en circulación); puede presentarse de manera asintomática o bien pueden aparecer síntomas inespecíficos como fiebre, dolor de cabeza, náusea, diarrea, vómitos, dolor de músculos y ganglios linfáticos agrandados.

Algunas señales visibles características son las lesiones cutáneas, que son signos de puerta de entrada del parásito, de esta manera puede observarse la presencia de una roncha o pápula en la piel llamada “chagoma de inoculación” que es un nódulo subcutáneo con adenitis regional en el sitio de la picadura. En casos en donde la inoculación es ocular, se puede identificar, aunque poco frecuentemente (solamente el 2% de los casos agudos sintomáticos) el “signo de Romaña”, un edema bpalpebral unilateral con adenitis retroauricular (Organización Panamericana de la Salud).

Si no se trata la enfermedad durante esta etapa, que dura entre 4 y 8 semanas, la misma evolucionará a la fase crónica.

### **4.2. Etapa crónica indeterminada y crónica determinada**

Una vez resuelta la fase aguda, la parasitemia cae dando lugar al comienzo de la fase crónica, que se caracteriza por parasitemias fluctuantes y se divide en dos etapas: una indeterminada que es asintomática y una determinada que es sintomática. La etapa indeterminada es un período de tiempo que pueden durar meses a décadas, durante el cual los pacientes presentan evidencia de reconocimiento



del parásito por el sistema inmune, como por ejemplo serología positiva, pero ningún síntoma. La mayoría de las personas permanecen asintomáticas, aunque infectadas, durante el resto de su vida, pero se estima que alrededor de un 30% evolucionan a la fase crónica determinada (Espinosa et al. 1985; Pereira, Willcox, and Coura 1985). Durante la fase crónica determinada, las manifestaciones clínicas se deben a daños viscerales, siendo las más importantes las afecciones cardíacas: miocardiopatía, alteraciones del ritmo y conducción en el corazón, aneurisma apical e insuficiencia cardíaca causada por la destrucción progresiva del músculo cardíaco; y en menor medida los megasíndromes digestivos como dilatación del esófago o colon (Organización Panamericana de la Salud).

Las afecciones cardíacas y los megasíndromes digestivos pueden estar presentes en simultáneo o no, la incidencia de estos dos tipos de manifestaciones que varía en función de la región geográfica analizada está relacionada a la presencia de diferentes cepas parasitarias con tropismos tisulares y diferente virulencia (Gironès et al. 2014).

## **5. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas**

Durante la fase aguda el diagnóstico puede realizarse mediante métodos parasitológicos directos como la identificación de tripomastigotes por examinación al microscopio de sangre fresca anticoagulada u otros fluidos corporales como líquido cefalorraquídeo (Coura et al. 2002). Otro método parasitológico directo, es la técnica de PCR que agrega una alta sensibilidad. Estos métodos son también utilizados para el diagnóstico en neonatos con el objetivo determinar si hubo transmisión congénita; si esto no es realizado, se debe esperar alrededor de nueve meses, cuando los anticuerpos maternos

transferidos desaparecen, para llevar a cabo métodos de diagnóstico serológico (indirectos).

En la etapa crónica, las parasitemias son intermitentes por lo que el diagnóstico es serológico y se basa en la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*. El diagnóstico definitivo es producto del resultado positivo de al menos dos pruebas serológicas diferentes: ELISA, IFI o HAI que detectan anticuerpos específicos en el suero del paciente (Organización Panamericana de la Salud). Estos inmunoensayos se basan preferentemente en la utilización de antígenos diferentes, como el lisado parasitario total o antígenos recombinantes (Bern 2015). La técnica de PCR, durante la etapa crónica de la enfermedad, posee rangos de variabilidad de en la sensibilidad que van desde el 50% al 90% (Brasil et al. 2010), estos números se pueden deber a diversos factores que contribuyen a la variabilidad: cantidad de sangre, metodología, genes objetivo, fase de la infección, diversidad genética del parásito, país de origen del paciente, presencia de inmunosupresión (Schijman et al. 2011). De todas formas, es una herramienta de ayuda frente a resultados serológicos inconclusos (Pérez-Molina and Molina 2018). Finalmente, la relación entre la positividad en los métodos diagnósticos como la serología o PCR y la presencia de parásitos tisulares no está adecuadamente investigada en humanos, asumiéndose por ejemplo y sin suficiente evidencia que la serología positiva es un correlato de infección persistente, y que la serología negativa representa ausencia o resolución de la infección.

## **6. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas**

El tratamiento está indicado para cualquier persona durante la fase aguda o bien si ha habido reactivación de la infección (en casos de

inmunosuprimidos), en estos casos el tratamiento es altamente efectivo y la enfermedad puede ser completamente curada. La eficacia del tratamiento disminuye a medida que la infección se aleja de la etapa aguda, a pesar de esto el tratamiento también es indicado para pacientes en fase crónica indeterminada con el potencial objetivo de prevenir o retrasar el desarrollo de la enfermedad (WHO World Health Organization 2018).

En la actualidad existen dos drogas nitroheterocíclicas con eficacia comprobada: el benznidazol (BNZ), un nitroimidazol (Sgambatti de Andrade et al. 1996; Sosa-Estani et al. 1998; Viotti et al. 2006) y el nifurtimox (NFX), un nitrofurano, ambos compuestos fueron desarrollados en las décadas de 1960 y 1970 (Figura I3). A pesar de que ambas drogas pueden producir reacciones adversas, BNZ presenta un perfil más seguro, razón por la cual es utilizado como primera línea de tratamiento (Viotti et al. 2009).

Ambos medicamentos son prodrogas que requieren ser activadas para llevar a cabo sus efectos citotóxicos, este proceso es llevado a cabo por nitroreductasas parasitarias que reducen los grupos nitro (Wilkinson et al. 2011). Basado en la sensibilidad al oxígeno, las nitroreductasas pueden dividirse en dos grupos: las tipo I, insensibles a oxígeno, típicamente presentes en bacterias y con un solo registro de enzimas de este tipo en tripanosomas (Kubata et al. 2002; Murta et al. 2006) y las tipo II, sensibles a oxígeno y propuestas como principal mecanismo de activación compuestos nitroheterocíclicos (Docampo 1990; Viodé et al. 1999).

### **6.1. Nifurtimox**

El NFX fue la primer droga que comenzó a utilizarse para el tratamiento del Chagas, a posteriori, del primer intento fallido por

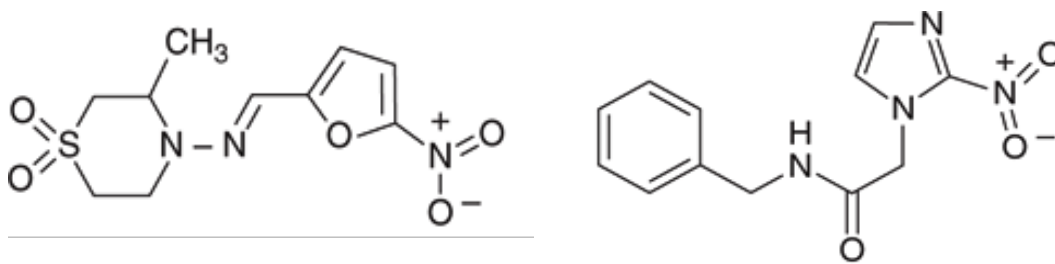
tratar la enfermedad con nitrofurazona. Los primeros ensayos clínicos con esta droga comenzaron en 1965 en Sudamérica y fueron el puntapié inicial para su utilización. Esta droga posee un perfil farmacológico menos seguro que el BNZ, por este motivo, suele ser la segunda línea de tratamiento siendo indicado cuando el paciente no tolera el BNZ o si este no está disponible en el sistema de salud. Se lo administrada de forma oral (15 mg/kg diarios) en 2 o 3 dosis durante 60 a 90 días.

## 6.2. Benznidazol

Hacia finales de la década del '60, se demostró por primera vez la actividad parasiticida del BNZ sobre *T. cruzi* (Grunberg et al. 1967). Si bien la dosis recomendada en adultos es entre 5 y 8 mg/kg dividido en dos dosis diarias durante 60 días, durante la fase crónica se recomienda un tratamiento de 30 días (Viotti et al. 2006).

Su mecanismo de acción no está claro, pero existen dos posibles hipótesis, ambas plantean la reducción del grupo nitro, unido al anillo imidazol, por parte de nitroreductasas parasitarias (Diaz de Toranzo et al. 1988; Maya et al. 2007). La primer hipótesis plantea que la activación de la droga por nitroreductasas tipo II (reducción mediada por un electrón) llevaría la formación de especies reactivas de oxígeno y posterior estrés oxidativo en el parásito. La segunda hipótesis involucra nitroreductasas tipo I (reducción mediada por dos electrones) NADPH dependientes, esta activación de la droga generaría hidroxilamina que a su vez se transformaría en otros metabolitos electrofílicos que generarían daño en el ADN parasitario (Wilkinson and Kelly 2012). Estos metabolitos también se unirían de manera covalente a proteínas, lípidos y ARN, dañando dichas macromoléculas.

El efecto deletéreo de la droga sobre el ADN, también se debería a la sobreexpresión de proteínas reparadoras, esto ha sido demostrado mediante la presencia de ADN desempaquetado de parásitos tratados con BNZ (Rajão et al. 2014). Por otro lado, existe una estrecha relación entre la activación del sistema inmune (debida a la infección), la presencia de interferón- $\gamma$  endógeno y la eficacia de la droga, que aumenta su actividad tripanocida en presencia de este (Romanha et al. 2002). Si bien, hay una gran evidencia sobre diversos mecanismos de acción de la droga, muchos de estos aún permanecen inciertos y solo estudiados en otros tripanosomátidos, por lo que su descripción es necesaria para la comprensión de la resistencia a estas drogas y el planteo de nuevos tratamientos farmacológicos o nuevas combinaciones de fármacos.



**Figura I3.** De izquierda a derecha: estructura molecular del NFX y del BNZ.

### 6.3. Reacciones adversas asociados al tratamiento

El NFX presenta reacciones adversas con una frecuencia de entre el 43- 97.5 %, llevando a una discontinuación del tratamiento en un gran porcentaje de casos (Jackson et al. 2010). Entre las reacciones

más frecuentes se encuentran: anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas, excitabilidad y eventualmente manifestaciones como náuseas o vómitos (Coura and Castro 2002).

Para el BNZ, las reacciones adversas incluyen neuropatías, síntomas gastrointestinales y dermatológicos, derivando en un 20% de tratamientos interrumpidos (Viotti et al. 2009). Los síntomas de toxicidad media pueden ser tratados con antistamínicos, corticosteroides o ambos y solamente en caso de toxicidad severa el tratamiento debe ser suspendido (Pérez-Molina and Molina 2018).

Las reacciones adversas presentadas por el NFX, son mayormente eventos asociados al sistema nervioso central, mientras que en el caso del BNZ suelen ser relacionados a reacciones alérgicas de la piel. En la Tabla I1 describe la frecuencia de aparición de las reacciones más comunes.

Por otro lado, la población de pacientes pediátricos, tolera mejor ambos tratamientos respectivamente, en el caso del BNZ la incidencia de eventos adversos se halla asociada a la edad del paciente, observándose reacciones adversas en niños mayores a siete años, mientras que en niños menores la aparición de estas es casi nula (Altcheh et al. 2011).

	Reacción Adversa	Frecuencia
<b>Benznidazol</b>	Dermatitis alérgica	29-50 %
	Parestesia	0-30 %
	Neuropatía periférica	0-30 %
	Anorexia y pérdida de peso	5-40 %
	Náuseas o vómitos	0-5 %
	Leucopenia	< 1 %
	Trombocitopenia	< 1 %
	<b>Nifurtimox</b>	Anorexia y pérdida de peso
Náuseas		15-50 %
Vómitos		15-26 %
Malestar abdominal		12-40 %
Dolor de cabeza		13-70 %
Mareos o vértigo		12-33 %
Cambios de humor		10-49 %
Insomnio		10-54 %
Mialgia		13-30 %
Neuropatía periférica		2-5 %
Decrecimiento memoria corto plazo		6-14 %
Leucopenia		< 1 %

**Tabla I1.** Reacciones adversas y frecuencias asociadas al tratamiento en adultos con BNZ y NFX respectivamente. Tabla basada y modificada de (Bern 2015).

## 7. Aspectos generales sobre farmacología

### 7.1. Metabolismo

El metabolismo de drogas es el conjunto de procesos, que permiten que las mismas sean biotransformadas con el objetivo de ser más fácilmente eliminadas por el organismo. La eliminación de drogas ocurre formalmente en los riñones, que tienen la capacidad de filtrar

moléculas pequeñas dependiendo de su tamaño, carga y solubilidad en agua. En este contexto, surge el concepto de “clearance”, que se define como la cantidad de droga que se limpia de un volumen de fluido (sangre, plasma, órgano) por unidad de tiempo. Para aquellas drogas que no sufren ninguna biotransformación, es decir, que no son metabolizadas, el clearance total es igual al clearance renal, mientras que para la mayoría de las drogas, que si son metabolizadas, el clearance total es una combinación de las contribuciones parciales de los clearances de otros órganos, como el hígado.

Una de las funciones más importantes del hígado consiste en, mediante enzimas, biotransformar agentes lipofílicos incrementando su solubilidad en agua para facilitar su eliminación en los riñones. El hígado no solo libera a circulación productos metabólicos más polares para que sean más fácilmente eliminados, sino que también puede remover estos productos de manera física mediante su excreción a la bilis, cuya eliminación es vía heces.

El proceso de biotransformación es llevado a cabo por una batería de enzimas presentes en mayor proporción en el hígado, si bien existen distintos tipos de enzimas, las más importantes en lo que respecta a biotransformar hidrocarburos aromáticos en compuestos más polares son un conjunto de enzimas que absorben luz UV a 450 nm cuando se reducen y unen a monóxido de carbono. Esta familia de enzimas se denomina citocromo P450 monooxigenasa o citocromo P450 oxido-reductasas (CYP450), y si bien su principal función implica oxidaciones, conservan la capacidad de reducir (Gorsky, Koop, and Coon 1984), ya que han evolucionado a partir de enzimas bacterianas encargadas de reducir compuestos en ausencia de oxígeno.

Los estadios de biotransformación se dividen en dos fases, I y II, la Fase I describe principalmente reacciones de funcionalización,



mediadas principalmente por CYP450, mientras que la Fase II está representada por reacciones de conjugación (Figura I5).

Muchas enzimas pueden ser inhibidas o inducidas, por ejemplo por alimentos, por lo tanto es de suma importancia describir las enzimas responsables de la biotransformación de una droga, a fin de conocer qué factores externos podrían afectar su metabolismo y por lo tanto sus concentraciones plasmáticas. Por otro lado, las reacciones adversas a un medicamento, suelen ser causadas por metabolitos de la droga (Grillo 2015; Thompson et al. 2016) y en su mayoría son dosis dependiente (Aronson and Ferner 2016), lo que remite a la necesidad de comprender y describir los procesos metabólicos que sufre una droga.

#### **7.1.1. Reacciones de Fase I y II**

Las reacciones de Fase I describen principalmente reacciones oxidativas aunque también reacciones de reducción, hidrólisis, hidratación, metilación y desulfuración. Estas reacciones son catalizadas en su mayoría por CYP450, pero también por otras enzimas como flavin monooxigenasa, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, aldehído oxidasa, amino oxidasa, etc.

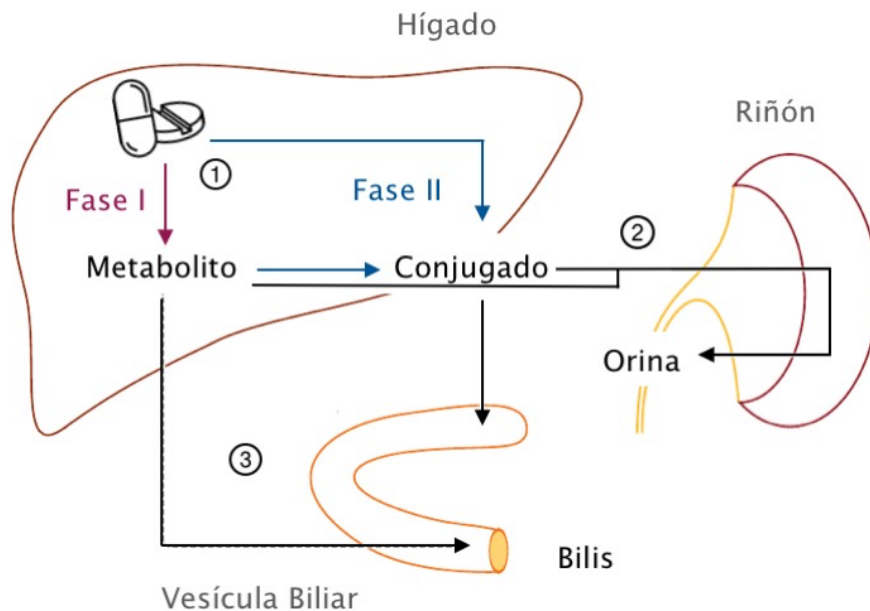
Los CYP450 requieren oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato, estas reacciones son monooxigenaciones en donde solo uno de los átomos de oxígeno es incorporado en la molécula del sustrato, mientras que el otro es reducido hasta agua. Para llevar a cabo este proceso se requiere de un dador de electrones que generalmente es el citocromo P450 reductasa (CPR) o, en menor medida, el citocromo b5. La CPR es un complejo enzimático que contiene flavin adenin dinu-

cleótido/ flavin mononucleótido, enzimas que catalizan la transferencia de electrones provenientes del NADPH hacia el grupo prostético hemo del CYP450.

Las enzimas citocromos (CYPs) de cualquier fuente, son clasificadas en función de la homología en la secuencia de aminoácidos, siendo que si dos CYPs tienen en común el 40 % de la estructura total de aminoácidos, entonces pertenecen a la misma familia. Solo 18 familias se encuentran presentes en humanos y para identificarlas se las numera (CYP1, CYP2, CYP3, etcétera). Las subfamilias se identifican con un 55% de homología en la secuencia y se las nombra con letras (CYP2A, CYP2B, CYP2C); dentro de una misma subfamilia existen las “isoformas” que comparten un 97% de la secuencia aminoacídica y para nombrarlas se vuelven a utilizar números (CYP1A1 y CYP1A2) (P.B. Danielson 2005).

Las reacciones de Fase II describen procesos conjugativos en donde azúcares endógenos solubles, sales o aminoácidos son agregados a xenobióticos o compuestos endógenos. Si bien el término “Fase II” sugiere que es un proceso que ocurre luego de la “Fase I”, este orden no es determinante existiendo muchos ejemplos de conjugaciones de drogas que no sufrieron ningún proceso metabólico previo.

Los productos de Fase II, tienden a ser altamente solubles en agua, no obstante, en muchas ocasiones se pueden obtener especies tóxicas o metabolitos menos solubles en agua que la droga madre.



**Figura I5.** Metabolismo hepático de drogas. Los fármacos pueden sufrir reacciones de Fase I y Fase II, exclusivamente una de ellas (1) o ninguna (si no es metabolizado). Los metabolitos o conjugados polares se excretan por orina (2), mientras que los no polares serán excretados por bilis (3).

## 8. Farmacología de benznidazol

Los estudios farmacológicos del BNZ son escasos, existiendo una ausencia de información en lo que respecta a vías metabólicas en el parásito y en mamíferos, descripción de metabolitos e identificación de enzimas que lo metabolizan. A pesar de que un período de tiempo acotado, alrededor de la década de los '80, existió un fuerte interés por estudiar esta droga, pasado este auge, las publicaciones farmacológicas sobre el BNZ comenzaron a disminuir debido a diversas causas: por un lado, la falta de interés por enfermedades olvidadas y por otro lado la discontinuación del medicamento por parte de la compañía farmacéutica que lo producía. La ausencia de BNZ en diversos

países fue tangible durante varios años hasta el retorno de su producción en Brasil. (Medicos sin Fronteras 2011).

### 8.1. Metabolismo

Estudios *in vitro* con microsomas y homogenatos de distintos tejidos han demostrado que el BNZ se metaboliza en condiciones de hipoxia o en atmósferas saturadas de nitrógeno y en presencia de NADPH (Masana, de Toranzo, and Castro 1984; Walton, Bleehen, and Workman 1987; Workman, Walton, and Lee 1986). Muchos de estos trabajos han sido llevados a cabo con homogenatos provenientes de tejidos tumorales, debido al fuerte interés en la década de 1980 por emplear BNZ como quimiosensibilizante, a fin de aumentar el efecto de agentes quimioterapéuticos frente a células tumorales. Los procesos nitroreductivos observados *in vitro* y en condiciones de hipoxia, serían llevados a cabo por nitroreductasas sensibles a oxígeno. A pesar de la evidencia *in vitro*, también hay evidencia sólida de nitroreducción *in vivo* con la descripción de un metabolito producto de esta biotransformación (Walton and Workman 1987). La detección en orina humana de solo un 5% de la dosis oral administrada de BNZ (Marsón et al. 2013), permite considerar que la droga está siendo excretado por otra vía, o bien biotransformada y excretada como metabolito, considerando el metabolismo hepático como posible responsable.

Los escasos estudios realizados al día de la fecha, describen la presencia de productos de biotransformación en modelos *in vitro* o en modelos animales, sin embargo existe una gran ausencia de estudios pertinentes en humanos.

## 8.2. Farmacocinética

Los primeros estudios de farmacocinética del BNZ en humanos fueron realizados entre 1979 y 1980 (Raaflaub 1980; Raaflaub and Ziegler 1979) y han sentado las bases para definir la dosis utilizada hasta la actualidad. Debido a la inconsistente disponibilidad del fármaco, entre otras razones, a lo largo de los años se reportaron muy pocos estudios conduciendo a una carencia de datos farmacocinéticos. En los últimos años se han publicado nuevos trabajos (Garcia-Bournissen et al. 2009; Molina et al. 2017; Müller Kratz et al. 2018; Soy et al. 2015) que permitieron mejorar el conocimiento sobre los parámetros farmacocinéticos, aun así, continúan los esfuerzos por optimizar la terapia con esta droga, ya sea ajustando el régimen actual de dosis o bien combinando BNZ con otros medicamentos (Müller Kratz et al. 2018).

Por otro lado, el modelo murino de infección aguda para el estudio de esta enfermedad es ampliamente utilizado, existiendo un gran consenso y conocimiento en lo que respecta a factores relacionados a la variabilidad en condiciones experimentales (Chatelain and Konar 2015). Al momento de evaluar la acción terapéutica del BNZ en estos modelos, se ha observado que la selección de la dosis terapéutica está basada en la utilización de dosis máximas efectivas en ratones infectados con diferentes cepas (Filardi and Brener 1987). Si bien los modelos murinos requerirían dosis más elevadas para obtener los mismos efectos que en humanos (Perdomo et al. 2013), esta evidencia no justifica la selección de dosis terapéutica utilizada. Existen pocos trabajos reportados de farmacocinética de BNZ en un modelo murino sano (Perin et al. 2017, 2020), que han descrito algunos parámetros farmacocinéticos, no obstante, no se estaría teniendo en

cuenta el posible efecto de la infección. Por este motivo es necesario estudiar las concentraciones plasmáticas y tisulares del BNZ en ratones con el objetivo de refinar los esquemas terapéuticos en el modelo murino.

En el pasado los estudios farmacocinéticos estaban enfocados en el individuo, diseñándose con el objetivo de obtener la máxima información de la disposición de los fármacos en un individuo concreto. Lamentablemente, esta metodología adolece de numerosas desventajas y su validez externa, es decir al extrapolar la información a la población en general, es limitada. Como consecuencia, se originó el concepto de farmacocinética poblacional, en donde se determinan parámetros farmacocinéticos poblacionales que definen el comportamiento farmacocinético típico de un fármaco en un gran número de pacientes.

La farmacocinética poblacional puede ser definida como el estudio de la variabilidad en las concentraciones plasmáticas de una droga entre individuos, bajo un régimen de dosis de estándar (Aarons 1991). Este enfoque apunta a estimar la variabilidad y los parámetros farmacocinéticos en la población de estudio en vez de calcularlos en cada individuo, utilizando un alto número de individuos pero sin necesitar una gran cantidad de muestras, en comparación con el enfoque tradicional (García-Bournissen et al. 2009).

## **9. Metabolismo parasitario de BNZ**

El mecanismo de acción del BNZ requiere del metabolismo parasitario, es decir, que la droga sea reducida a metabolitos electrofílicos por acción de nitroreductasas parasitarias (Díaz de Toranzo et al. 1988; Hall and Wilkinson 2012; Maya et al. 2007). Existe evidencia de que

estos metabolitos se unen a proteínas, lípidos, ADN y ARN resultando en el daño de estas macromoléculas, pero el mecanismo de acción completo aún se encuentra bajo estudio.

Se han descrito productos metabólicos parasitarios de biotransformación del BNZ y se han propuesto enzimas como responsables de esta biotransformación (Garavaglia et al. 2016; Trochine et al. 2014; Wilkinson et al. 2011), sin embargo, estas descripciones que remiten a parásitos en fase epimastigote, podrían no representar correctamente el metabolismo parasitario de las fases tripomastigote y amastigote, que son los estadios parasitarios con hospedador vertebrado, y por lo tanto, con mayor relevancia clínica. Existe una fuerte evidencia sobre las diferencias fisiológicas entre las fases parasitarias de *T. cruzi*: presencia de enzimas, transportadores y diferencias morfológicas entre otras (Almeida-de-Faria et al. 1999; Santos da Silva et al. 2019; Zenian and Kierszenbaum 1983), motivo por el cual, es crucial la descripción del metabolismo parasitario del BNZ durante la fase tripomastigote y/o amastigote. La descripción de los procesos de biotransformación en los diferentes estadios parasitarios, permitiría una mejor comprensión del mecanismo de acción de esta droga.

## **10. Biomarcadores en enfermedad de Chagas**

Los biomarcadores se definen como aquellas características biológicas, bioquímicas, antropométricas, fisiológicas, etc., objetivamente mensurables, capaces de identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Strimbu and Tavel 2010), por lo tanto, pueden ser utilizados

para diagnósticos, pronósticos, monitoreo de enfermedades, como indicadores de respuestas terapéuticas y como predictores de reacciones adversas entre otros usos (Aronson and Ferner 2017).

En el contexto de la enfermedad de Chagas, los biomarcadores se han utilizado con diferentes objetivos: antígenos humanos propuestos como biomarcadores de respuesta al tratamiento, seguimiento de perfiles de células B y T parásito específicas como marcadores inmunes para el seguimiento de la progresión de la enfermedad y amplificación de ADN del parásito como marcador de respuesta terapéutica, entre otros ejemplos (Echeverría et al. 2017; Pinazo et al. 2014; Pinho et al. 2016).

### **10.1. Biomarcadores predictores de reacciones adversas**

Las reacciones adversas a medicamentos pueden tener diversas causas y varían ampliamente en severidad; aquellas más leves suelen ser resueltas retirando el medicamento o reduciendo la dosis, pero aquellas más graves, pueden conducir a lesiones de órganos o tejidos e incluso pueden ser fatales. El desarrollo de biomarcadores para la predicción, el diagnóstico y el pronóstico de reacciones adversas es fundamental para evitar aquellos casos graves.

Bajo este concepto y con foco en enfermedad de Chagas, sería de gran utilidad contar con biomarcadores séricos que permitiesen predecir, una vez administrado el medicamento, si el paciente tendrá altas probabilidades de sufrir una reacción adversa.



**Objetivo general**

Estudiar y describir la farmacología de los medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas con foco en el BNZ.

**Objetivos**

-Detectar, identificar y describir, en muestras de orinas orina de pacientes con enfermedad de Chagas, los principales metabolitos del BNZ.

-Buscar evidencia de metabolismo hepático mediante ensayos *in vitro* empleando microsomas obtenidos de hígados de diferentes especies de mamíferos.

-Estudiar la farmacocinética del BNZ y sus metabolitos en un modelo murino.

- Detectar, identificar y describir los principales metabolitos parasitarios del BNZ y contrastarlos con el metabolismo del BNZ mamífero.

-Sentar las bases para el diseño de un estudio para la identificación de biomarcadores predictores de reacciones adversas relacionadas al BNZ o al NFX.

# MATERIALES *y* MÉTODOS

## 1. Materiales

### 1.1. Solventes, soluciones tampones, medios de cultivos y reactivos de usos diversos

- PBS 10X
- Solución tampón A:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, pH = 7.6
- Solución fisiológica de uso hospitalario
- Solución de lisis de glóbulos rojos (solución tampón Tris 0.17M, cloruro de amonio 0.83 %, pH 7.2)
- Solución B: agua destilada y acetonitrilo (50:50) con clozapina 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Solución C: acetonitrilo con clozapina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Solución tampón D:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  10 mM, 0.1% HCOOH
- Solución E: acetonitrilo con NFX 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
- Solventes para fases móviles de cromatografía líquida: acetonitrilo, metanol y ácido fórmico
- Cultivo celular: RPMI-1640 con L-glutamina (Sigma), SFB (Natocor), penicilina, estreptomina, gentamicina, tripsina, bicarbonato de sodio, azul tripán
- Metabolismo *in vitro*: ácido ascórbico, ácido tricloroacético, clozapina, NADPH, BNZ, NFX, p-NP, UDPGA
- Cuantificación de proteínas: reactivo de Bradford (azul brillante de Coomassie G- 250 0.10% p/v, etanol 95% 4.7% p/v, ácido fosfórico 8.5% p/v), kit de cuantificación proteínas por método BCA (ácido bicinónico), BSA.
- Proteómica:  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0.1M pH 7.5 (ABS), DTT, IAM.

## **1.2. Equipamiento**

- Cromatógrafo Shimadzu Nexera X2 (UHPLC) acoplado a espectrómetro de masas Sciex 6500, triple cuadrupolo con trampa de iones, fuente de ionización por electrospray (ESI-QqQ)
- Lector de microplacas
- Centrifuga refrigerada Eppendorf 5427 R
- Ultracentrífuga refrigerada Sorval
- Centrífuga para capilares
- Homogeneizador Potter-Elvehjem
- Microscopio óptico
- Microscopio invertido

## **2. Métodos**

### **2.1. Detección de BNZ e identificación de sus principales metabolitos en orina humana**

#### **2.1.1. Recolección y procesamiento de muestras**

Se obtuvieron muestras de orina, recolectada durante 24 horas, de pacientes (N=4) con enfermedad de Chagas, en estadio crónico y bajo tratamiento con BNZ, del Servicio de Parasitología y Chagas del HNRG. El tratamiento consiste en 5 a 8 mg/kg dividido en dos dosis diarias durante 60 días.

A modo de control se recolectaron orinas de personas sanas sin enfermedad de Chagas y por lo tanto sin estar bajo tratamiento con BNZ (N=3). Una vez medido el volumen de cada muestra de orina, se conservaron 300 ml fraccionados en tubos a -70°C hasta su uso. Previo a cada análisis, una fracción de las muestras de orina se descongeló y precipitó con solución E (1:1) a fin de eliminar impurezas y potencial presencia de proteínas. Tras el agregado del solvente se centrifugó a 14.200 g por

cinco minutos, en una microcentrífuga Eppendorf. El sobrenadante se utilizó para los diferentes análisis y el proceso se repitió con todas las muestras.

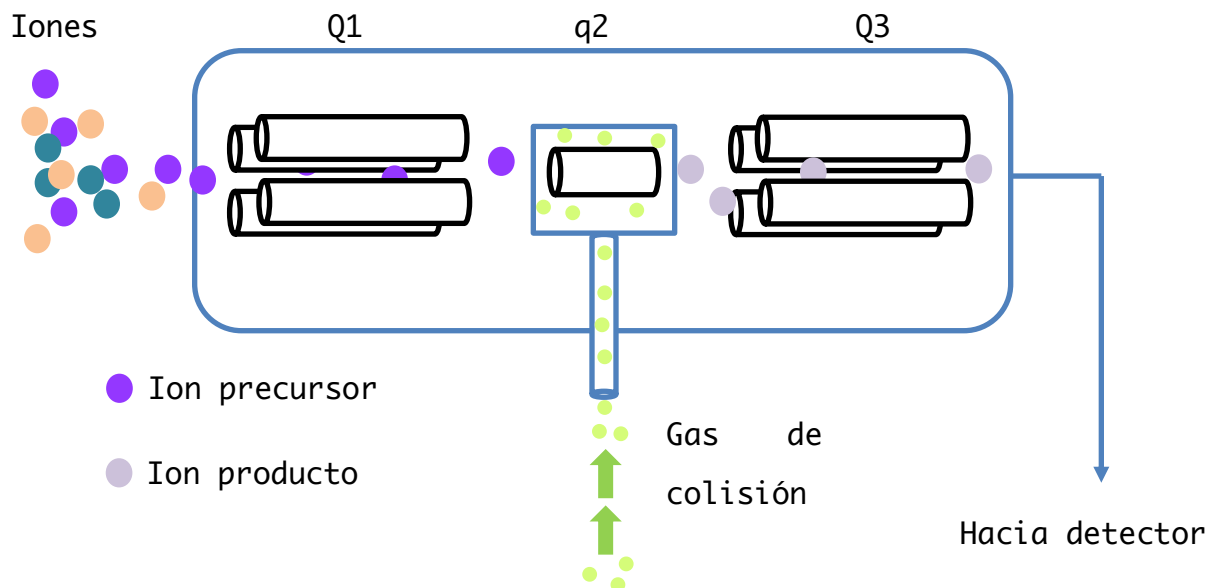
### 2.1.2. Detección y cuantificación de BNZ

El BNZ fue detectado y cuantificado por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo (UHPLC-ESI-QqQ). La puesta a punto de las condiciones cromatográficas se llevó a cabo empleando muestras de orina control a las que se les agregaron concentraciones conocidas de BNZ estándar para luego ser procesadas según se describió en la Sección 2.1.1.. El objetivo de emplear orina control fue utilizar el mismo tipo de matriz que las muestras,

Una vez identificado el BNZ en los cromatogramas se puso a punto el método de detección definiendo la corrida cromatográfica por gradiente y empleando una columna Shimadzu C18, Shim-Pack XR-ODSII, 75mm x 3 mm x 2.2 $\mu$ m. La fase móvil A consistió en agua destilada con ácido fórmico 0.1% y la fase móvil B en acetonitrilo, el flujo fue de 0.3 ml/min. El gradiente empleado fue 18% a 90% de fase móvil B en dos minutos continuando en 90% por dos minutos más. El espectrómetro de masa fue operado en modo EMS con nitrógeno como gas de secado a 600°C, gas cortina 20 psi, voltage del spray 5000v y rango de masas entre 50-900 Da; la ionización fue por electrospray en modo positivo. Todos los solventes fueron filtrados con una membrana de PTFE de 0.22  $\mu$ m antes de su utilización y desgaseados con bomba de vacío.

Luego de establecerse las condiciones cromatográficas se procedió al análisis por MS/MS, que permite fragmentar una molécula (ion precursor) mediante colisiones de alta o baja energía con un gas (CID), obteniendo un fragmento sin carga, no detectable, y uno cargado, detectable (ion producto). En el primer cuadrupolo (Q1) del espectrómetro de masa se

selecciona el ion precursor de interés, en este caso BNZ, y la colisión ocurre en la celda de colisión (q2). En el tercer cuadrupolo (Q3), se obtienen el o los iones producto (Figura MyM1) .



**Figura MyM1.** Esquema de funcionamiento de espectrómetro de masas con triple cuadrupolo.

Puede ocurrir que un ion precursor sufra dos o mas fragmentaciones diferentes, originando diversos iones producto, por otro lado, si la energía de colisión es lo suficientemente alta, pueden ocurrir dos fragmentaciones sucesivas observándose el ion precursor, el ion producto y un tercer ion resultado de la fragmentación del último.

El patrón de fragmentación característico del BNZ se estableció variando las energías de colisión y caracterizando los diferentes fragmentos obtenidos en función de las relaciones masa/ carga de los iones y posibles pérdidas lógicas de masa.

La cuantificación del BNZ se llevó a cabo bajo el modo de escaneo MRM, que funciona realizando el seguimiento de transiciones entre un ion precursor (BNZ) en Q1, y sus iones producto, obtenidos en la celda de colisión (q2), en Q3. Con este objetivo, se seleccionaron del patrón de fragmentación de BNZ, las transiciones más intensas para llevar a cabo este método, que ofrece alta sensibilidad y selectividad debido a la especificidad de la transición ion precursor-ion producto. La curva de calibración, construida con BNZ estándar (Elea, Argentina), cubrió el rango de concentraciones de 0.01 µg/ml a 100 µg/ml.

### **2.1.3. Identificación de los principales metabolitos del BNZ en orina**

En principio se llevó a cabo un escaneo general exploratorio de las muestras utilizando el método EMS, que utiliza el Q1 del espectrómetro de masa. El objetivo fue contrastar los espectros obtenidos de las muestras de pacientes con los controles a fin de hallar picos (iones) diferenciales. Una vez detectados, aquellos iones presentes en las orinas de pacientes fueron sometidos a MS/MS para la obtención de los patrones de fragmentación que sirvieran como guía para sugerir las estructuras moleculares. Por otro lado, se emprendieron búsquedas dirigidas, utilizando el Q1, de metabolitos teniendo en cuenta la bibliografía, como es el caso de productos de la nitroreducción del BNZ. Para identificar productos metabólicos de Fase II (conjugaciones), se empleó el modo de escaneo NL que permite detectar pérdidas neutras de masa entre un ion precursor y un ion producto luego de la fragmentación. Diversas conjugaciones típicas del metabolismo Fase II presentan pérdidas neutras características, como es el caso de las conjugaciones con ácido glucurónico; al fragmentar al conjugado se genera una ruptura tal que la pérdida de masa neutra detectable es de 176 g/mol. Si bien el ácido glucurónico pesa 194 g/mol, en la ruptura también se pierde una

molécula de agua, haciendo que la detección deba fijarse en 176 u. Se configuraron las siguientes pérdidas neutras típicas: ácido glucurónico (176 unidades), S-cisteína (119 unidades), S-glutathión (305 unidades) y N-acetilcisteína (119 unidades).

Identificados los principales metabolitos, se desarrolló un método con escaneo por MRM para la detección de los mismos, seleccionando las dos transiciones más importantes de cada uno. Es importante identificar metabolitos por Q1 y por MRM debido a que la información obtenida por MRM es más precisa y sensible que la obtenida por Q1 pero no permite ver las intensidades absolutas dado que se configuran los parámetros del equipo específicamente para cada ion.

## 2.2. Metabolismo de BNZ en mamíferos, modelo *in vitro*

Para la descripción del metabolismo mamífero *in vitro* en aerobiosis, se diseñó un ensayo con microsomas a fin de determinar si el BNZ era susceptible de ser metabolizado en dichas condiciones. Los microsomas son vesículas que se generan por centrifugaciones seriadas a partir de homogenato de tejido, están formadas por fragmentos de la membrana del retículo endoplasmático y por ende contienen muchas de las enzimas responsables del metabolismo de drogas. Esto convierte a los microsomas en un excelente modelo para metabolismo *in vitro*.

Se emplearon microsomas purificados a partir de hígado, la selección de éste se debe a que es el órgano metabolizador por excelencia, conteniendo la mayor concentración de enzimas encargadas de biotransformar xenobióticos. Las purificaciones de microsomas hepáticos se llevaron a cabo con dos especies murinas y una porcina con el fin de obtener información de diferentes especies mamíferas. Los modelos murinos son ampliamente utilizados en metabolismo de drogas, mientras que, el modelo porcino se ha comenzado a utilizar más frecuentemente en los



últimos años debido a la similitud con la especie humana en el perfil enzimático hepático (Puccinelli, Gervasi, and Longo 2011; Skaanild 2006).

### 2.2.1. Sacrificio y toma de muestras murinas y porcinas

Los hígados porcinos (*Sus scrofa domestica*) fueron donados gentilmente por el frigorífico La Pompeya (Murguiondo 1954, C1440 CNR, Buenos Aires, Argentina); tras el sacrificio, los órganos fueron inmediatamente colocados en hielo para su transporte hasta el Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez” (HNRG). Para las muestras hepáticas murinas se utilizó la cepa BALB/C de ratones, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UBA), y la cepa Wistar de ratas, provenientes del bioterio del HNRG. Para realizar la extracción quirúrgica del hígado, los animales fueron sacrificados en cámara atmósfera saturada de CO<sub>2</sub> (caudal de 7 litros/min durante aproximadamente 3 minutos). Una vez obtenidos, se colocaron en hielo y se inició inmediatamente el proceso de purificación de microsomas.

### 2.2.2. Purificación de microsomas hepáticos

Para las especies murinas, por cada purificación, se utilizaron entre dos y tres hígados completos respectivamente, mientras que para cerdo, y debido a su gran tamaño, se emplearon trozos escindidos de entre uno y dos hígados por purificación. Para la escisión de los trozos de hígado de cerdo, se tomó el debido cuidado de extraer tejido de diferentes zonas lobulares y de diferentes lóbulos. Se realizaron 2 purificaciones diferentes (con lotes diferentes) para cerdo, para ratón y para rata respectivamente.

El protocolo (Sabatini 2014) fue llevado a cabo para las tres especies animales de la misma forma y los hígados utilizados fueron conservados en hielo durante todo el procedimiento.

En principio, los órganos debieron ser lavados para retirar la sangre y los posibles coágulos formados, por lo que fueron colocados en un recipiente con aproximadamente 200 ml de solución tampón A fría, en agitación. El proceso fue repetido, en promedio 5 veces, hasta la remoción de sangre y coágulos visibles. Las muestras fueron transferidas a una bandeja esterilizada en donde se removi6 el tejido conectivo y luego se pes6 el tejido. Por cada proceso de purificación se emplearon entre 50 y 100 gr de tejido limpio y seco.

Los trozos de hígado se desmenuzaron, bistorí mediante, en pequeños trozos hasta obtener la consistencia de una pasta. El producto obtenido fue colocado en un vaso de precipitados con cuatro o cinco volúmenes de solución tampón A fría en agitación por unos minutos, luego se decant6 el tejido e inmediatamente se descart6 el medio a fin de remover los restos de sangre que pudieran haber quedado. El proceso fue repetido hasta la completa remoción de la sangre. El tejido limpio y desmenuzado se homogeneizó con cuatro volúmenes de solución tampón A fría en un homogeneizador Potter-Elvehjem mediante 10 golpes en promedio. El homogenato obtenido fue filtrado con cinco o seis capas de gasa y posteriormente llevado a volumen con solución tampón A (20% m/v).

El homogenato fue centrifugado a 10.000g durante veinte minutos a 4°C en una ultracentrífuga Sorval; el pellet obtenido, que contiene núcleos celulares y otras organelas fue descartado y el sobrenadante, conteniendo los microsomas, fue conservado para ser centrifugado a 105.000 g durante una hora, a 4°C. Al finalizar la centrifugación se obtuvo un pellet que contiene la fracción microsomal, este fue resuspendido en solución tampón A y se conserv6 a -70°C hasta su utilización.

### 2.2.3. Cuantificación de proteínas en microplaca

La determinación de proteínas totales se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford para microplaca (Bradford 1976; Fernández and Galván 2006), que permite la cuantificación mediante la medición de la densidad óptica, a 590 nm, de los complejos coloreados formados entre proteínas y el colorante Coomassie G-250. Los microsomas purificados fueron sometidos a diluciones seriadas al medio en agua, luego 100  $\mu$ l fueron mezclados con 1 ml de reactivo de Bradford para ser leídos a 590 nm en el lector de placa. La curva de calibración fue construida con BSA como estándar y cubrió un rango de concentraciones entre 10 y 200  $\mu$ g proteína/ml.

### 2.2.4. Controles de actividad microsomal

Se seleccionaron las enzimas glucuroniltransferasa (UGT) y dos isoformas de la familia de enzimas citocromo P450 (CYP450) a fin de verificar la actividad de estas en los microsomas purificados.

#### 2.2.4.1. Determinación de actividad de CYP2E1/CYP3A4

Las isoformas 2E1 y 3A4 son de las más abundantes de la familia CYP450, ambas metabolizan una gran cantidad de drogas, incluyendo drogas estructuralmente similares al BNZ, y se encuentran representadas en las tres especies animales utilizadas en este trabajo (Martignoni, Groothuis, and de Kanter 2006; Puccinelli et al. 2011). El para-nitro-fenol (p-NP), es un sustrato ampliamente utilizado para verificar la actividad de la isoforma 2E1 (Skaanild and Friis 2007), que lo hidroxila, convirtiéndolo en 4-nitrocatecol (4-NC). Por otro lado, existe evidencia de que el p-NP, también es susceptible a ser hidroxilado en

el mismo sitio por la isoforma 3A4 (Puccinelli et al. 2011). La actividad de ambas enzimas se ve reflejada en un cambio colorimétrico medible en medio básico, por espectrofotometría (Cheng and Guengerich 2013).

Se prepararon 200  $\mu$ l de una solución de microsomas (1 mg/ml), con ácido ascórbico 2 mM y para-nitrofenol 41.8  $\mu$ g/ml, en solución tampón A concentración final 50mM, y se dejó estabilizar por quince minutos a 37°C. La reacción se inició con el agregado de NADPH concentración final 5 mM. Los microsomas con la droga fueron incubados durante una hora a 37°C, en estufa de cultivo con 5% CO<sub>2</sub>. Como control negativo se incubaron microsomas con p-NP y sin NADPH, y como blanco, microsomas con todos los cofactores y sin p-NP.

Finalizada la incubación, se procedió a la inactivación de las enzimas por desnaturalización a fin de detener la reacción, mediante el agregado de 90  $\mu$ l de TCA 20%, y se centrifugó a 14200 g por cinco minutos, en una microcentrífuga Eppendorf, para precipitar las proteínas. Luego se procedió a alcalinizar el sobrenadante obtenido, tomando una alícuota de 180  $\mu$ l y agregándole 20 $\mu$ l de NaOH 10 mM. Inmediatamente se midió la absorbancia a 510 nm para detectar el producto de la reacción enzimática.

#### **2.2.4.2. Determinación de actividad de UGT por glucuronización de para-nitrofenol**

El protocolo para determinar la actividad de esta familia de enzimas, es similar al descrito para la determinación de actividad de CYP2E1/3A4, con ligeras modificaciones. En principio, las enzimas UGT utilizan otros cofactores, por lo tanto, se reemplazó el ácido ascórbico por

cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) 5 mM y el NADPH por UDPGA, concentración final 5 mM.

### 2.2.5. Ensayos metabolismo *in vitro* de BNZ

Se realizó una solución con proteína microsomal, BNZ y ácido ascórbico (cofactor), en solución tampón A, que fue incubada durante a 10 minutos a 37°C a fin de estabilizarla, finalizado ese período de tiempo se procedió a agregar el NADPH para dar inicio a la reacción. El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ , con las siguientes concentraciones finales:

- 1 mg/ml de proteína microsomal
- ácido ascórbico 2 mM
- BNZ 40 mM (10 mg/ml)
- solución tampón A 50 mM
- NADPH 10 mM

La incubación fue de una hora, simulando tiempo infinito, a 37°C en estufa con 5%  $\text{CO}_2$ . Como blanco de reacción se utilizó el mismo esquema sin BNZ y como control negativo el mismo esquema sin NADPH, en ambos casos los correspondientes volúmenes fueron reemplazados por solución tampón A. Todas las variantes del ensayo se hicieron por triplicado. Una vez finalizada la incubación, se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de solución C (para precipitar proteínas) y se centrifugó a 14246 g en una microcentrífuga Eppendorf refrigerada durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue conservado a -70°C hasta su uso.

Este ensayo, fue replicado dos veces para cada especie animal, y lo único que se varió fue el origen de la proteína microsomal (rata, ratón o cerdo). Para cada ensayo se utilizó un nuevo lote de microsomas purificados.

Por otro lado, a fin de determinar si el BNZ o alguno de sus metabolitos es susceptible de ser conjugado con ácido glucurónico, se realizó un ensayo utilizando UDPGA y  $MgCl_2$  (5 mM) en vez de ácido ascórbico y NADPH. Se incluyó un tercer ensayo con NADPH y UDPGA juntos, en caso de que el BNZ requiera un paso previo de biotransformación antes de ser conjugado. Este ensayo fue llevado a cabo solo con microsomas de cerdo y ratón.

El BNZ fue cuantificado en todas las muestras por espectrometría de masas (escaneo por MRM), empleado una curva de calibración realizada por diluciones seriadas cubriendo rango de concentraciones de 0.01 a 100  $\mu g/ml$  de droga.

#### **2.2.6. Identificación de metabolitos de BNZ**

Se realizaron búsquedas dirigidas por MS de metabolitos de Fase I en los sobrenadante provenientes de ensayos con NADPH, y se buscaron conjugados con ácido glucurónico en los sobrenadantes provenientes de ensayos con UDPGA. Las búsquedas dirigidas se basaron en los hallazgos de los metabolitos identificados en orinas humanas (Sección 2.1.3.).

#### **2.2.7. Ensayo de cinética in vitro de metabolitos de BNZ**

Con el objetivo de obtener información acerca del orden de aparición de los metabolitos de BNZ, se realizó el protocolo descrito en la sesión 2.2.5, (para enzimas dependientes de NADPH) con la salvedad de que se utilizaron varios tiempos de incubación: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Se emplearon microsomas hepáticos de rata.

Las muestras fueron analizadas por MS, con búsquedas dirigidas, de la misma forma en que se describe en la Sección 2.2.6..

### **2.3. Modelo murino de farmacocinética poblacional de BNZ**

El modelo murino de infección aguda de Chagas es uno de los modelos más ampliamente utilizados, pese a esto, no hay información sobre las concentraciones plasmáticas de BNZ en ratones infectados experimentalmente. Por este motivo, se seleccionó el modelo murino de infección aguda de enfermedad de Chagas para llevar a cabo un ensayo de farmacocinética poblacional de BNZ.

Se utilizaron ratones machos (n = 28, 16 controles, 12 infectados) de la cepa BALB/C, de 2 meses de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UBA), estos fueron mantenidos con ciclos de luz- oscuridad de 12 horas, a 24°C, con alimento y agua ad libitum.

El proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del HNRG (número de protocolo: 2017-10).

#### **2.3.1. Infección de ratones**

La infección se realizó a los 30 días de edad de los ratones (n = 12) y bajo el protocolo evaluado y aprobado por el CICUAL del HNRG (número de protocolo: 2016-004). Brevemente, se inocularon 500 parásitos en estadio tripomastigote de la cepa VD por vía intraperitoneal, a partir del quinto día post-infección se llevaron a cabo todos los días, a modo de control, las parasitemias para cada animal. Bajo este modelo, el criterio de definición de estado de infección aguda se basa en alcanzar las máximas parasitemias (máxima cantidad de parásitos contados en sangre circulante) y este estado se suele establecer alrededor de los 15 días post-infección.

### 2.3.2. Parasitemias

Se recolectaron 5  $\mu\text{l}$  de sangre obtenida de la vena de la cola del animal y se incubaron con 20  $\mu\text{l}$  solución de lisis de glóbulos rojos durante 30 minutos a 37°C, al finalizar este tiempo se agitaron los tubos en vortex durante 2 a 3 minutos. Luego se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de la solución obtenida sobre una Cámara de Neubauer para realizar el conteo directo de parásitos móviles por observación en el microscopio (aumento de 400x).

El número de parásitos por ml de sangre se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ parásitos}}{\text{ml sangre}} = \# \text{ parásitos contados} * \text{factor dil} * 10^4$$

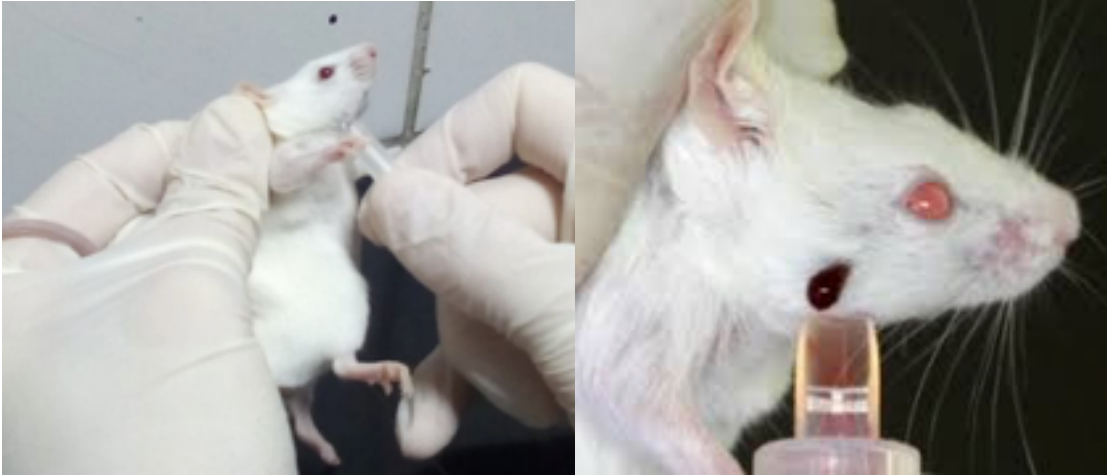
El objetivo de las parasitemias fue corroborar el estado de infección aguda.

### 2.3.2. Sacrificio y recolección de muestras

#### 2.3.2.1. Recolección de muestras de sangre por punción submandibular

Frente a la dificultad de canular venas en animales pequeños y a fin de obtener más de una muestra de sangre por ratón, se realizó un muestreo secuencial por punción submandibular sin necesidad de anestesia (Figura MyM 2). El plexo submandibular, es un pequeño haz vascular en la parte posterior de la mandíbula, en este punto las venas orbitales, la vena submandibular y otras venas que drenan la región facial se unen para formar el comienzo de la vena yugular (Golde, Gollobin, and Rodriguez 2005).





**Figura MyM2.** Muestreo de sangre por punción subamandibular.

Esta técnica permitió obtener múltiples muestras por individuo. Alternando la utilización del plexo submandibular derecho e izquierdo. Junto con las muestras obtenidas post sacrificio, algunos animales fueron muestreados hasta tres veces. La obtención de muestras repetidas, es de suma importancia en diseños experimentales que requieren esta característica, como es el caso de la farmacocinética poblacional en animales pequeños.

La sangre obtenida, entre 15 y 80  $\mu\text{l}$ , fue recolectada en tubos capilares de vidrio.

#### **2.3.2.2. Sacrificio y recolección de muestras de sangre**

En aquellos casos en donde ya se habían tomado muestras de ambos plexos, la tercera toma de muestra de sangre requirió del sacrificio del animal (cámara de  $\text{CO}_2$ , caudal de 7 litros/min durante aproximadamente 3 minutos), una vez sacrificado se procedió a recolectar la muestra de sangre con capilar de vidrio por corte de la vena renal.

### 2.3.2.3. Sacrificio y recolección de muestras de órganos

Se tomaron muestras de hígado, bazo, pulmón, músculo esquelético, corazón, cerebro y riñón, el sacrificio fue llevado a cabo de la forma descrita en la Sección 2.3.2.2.. Como control se realizó para cada tipo de órgano un pool de cada órgano, proveniente de 3 ratones (sanos o infectados según el grupo) sin haber recibido la dosis de BNZ. Los órganos fueron lavados con solución fisiológica para extraer el exceso de sangre, secados con papel y conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 2.3.3. Ensayo de farmacocinética

Debido al gran número de animales, el ensayo se dividió en distintos días, en una primera etapa se llevó a cabo el ensayo con los animales control ( $n = 16$ ) y en una segunda etapa con los animales infectados ( $n = 12$ ). Los animales recibieron una única dosis de 100 mg de BNZ/kg por sonda gástrica en un volumen 200  $\mu\text{l}$  de carboximetilcelulosa, la dosis fue ajustada para cada ratón, cada individuo fue pesado y en función de su peso se calcularon los mg exactos de droga a recibir.

Se partió de una solución stock de BNZ en carboximetilcelulosa (50mg/ml), elaborada utilizando pastillas de BNZ 100 mg (Abarax, Laboratorios Elea).

Los tiempos de muestreo fueron: 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 y 8 horas y se tomaron muestras de órganos a la 1.5, 6 y 8 horas, con un  $n = 3$  para infectados y un  $n = 3$  para controles (sanos).

#### **2.3.4. Procesamiento y extracción de BNZ y sus metabolitos**

##### **2.3.4.1. Muestras sanguíneas**

Las muestras de sangre en los capilares fueron inmediatamente procesadas, en primer lugar, se las centrifugó en una centrífuga para capilares durante 5 minutos a 5.000 rpm a fin de obtener el plasma. Se midió el volumen obtenido de plasma para cada muestra y luego se agregó igual volumen de solución C para precipitar proteínas y se centrifugó a 14.246 g en una microcentrífuga Eppendorf refrigerada durante 5 minutos a 4°C. Las muestras fueron conservadas a -70°C hasta su uso.

##### **2.3.4.2. Muestras de órganos**

Los órganos fueron descongelados, secados con papel y pesados, luego desmenuzados con un bisturí estéril y mezclados con 5 µl por gramo de tejido de solución B que permite la precipitación de proteínas y extracción de metabolitos polares. El producto obtenido se homogeneizó en un homogeneizador Potter-Elvehjem mediante 15 golpes y luego fue centrifugado a 14.246 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se conservó a -70°C hasta su uso.

#### **2.3.5. Cuantificación de BNZ y pseudo cuantificación de sus metabolitos**

Para la cuantificación de BNZ en plasma y en órganos, se empleó el método descrito previamente (Sección 2.1.2.). Las curvas de calibración se realizaron con muestras control, cubriendo rango de concentraciones de 0.01 a 100 µg/ml de droga. Cabe destacar que para cada tipo de tejido se construyó una curva de calibración utilizando un pool de tejido de ratones infectados y ratones sin infectar, no expuestos a BNZ.

Los metabolitos fueron detectados mediante búsquedas dirigidas, basadas en los hallazgos en orinas humanas (Sección 2.1.3), y cuantificados. El hecho de no contar con estándares de los diferentes metabolitos imposibilitó la construcción de curvas de calibración, y por ende no fue posible cuantificarlos. No obstante, se llevó a cabo una pseudo-cuantificación, es decir, se relativizaron las masas de los metabolitos a la masa de la droga “madre” utilizando la curva de calibración de BNZ, asumiendo que los metabolitos de BNZ presentan características de ionización y fragmentación similares a la droga madre en el espectrómetro de masas (Hatsis, Waters, and Argikar 2017; Vikingsson et al. 2017). Se emplearon los valores de áreas obtenidos con el modo de escaneo Q1 a fin de normalizar las condiciones de medición para todas las moléculas a detectar, ya que mediante el modo de escaneo MRM, las mediciones son más sensibles pero no son comparables entre moléculas, dado que estas fueron medidas bajo diferentes condiciones, optimizadas individualmente.

### 2.3.6. Modelo de farmacocinética poblacional

Mediante el software Monolix (Versión 2018R1 Lixoft) se desarrolló un modelo farmacocinético poblacional de BNZ, de un compartimiento con absorción y eliminación lineales. La estimación de los parámetros se realiza utilizando un modelo estadístico de efectos mixtos no lineales, con el algoritmo de Aproximación-Expectativa-Maximización Estocástica (SAEM del inglés *Stochastic Approximation Expectation Maximization*) disponible en el software. Se comparó el modelo farmacocinético seleccionado (modelo unicompartmental con absorción y eliminación lineales) con modelos más complejos, como el modelo bi y tricompartmental, pero estos no mejoraron el ajuste de los datos al modelo, por lo que se

decidió utilizar el modelo unicompartmental como el más apropiado para los datos.

#### **2.4. Perfil de metabolitos de BNZ producido por *Trypanosoma cruzi***

A fin de caracterizar el metabolismo parasitario del BNZ, se desarrolló un ensayo in vitro incubando parásitos en fase infectiva (tripomastigotes) con diferentes concentraciones de BNZ.

El Servicio de Parasitología y Chagas cuenta con un stock de la línea celular Vero (células epiteliales del riñón de mono) y de parásitos tripomastigotes, de diferentes cepas, conservados en tanque de nitrógeno líquido. Al momento de utilizar tripomastigotes para un ensayo no se utilizan los parásitos directamente del stock, sino que se inicia el ciclo replicativo utilizando como células hospedadoras, cultivos de de la línea celular Vero.

##### **2.4.1. Cultivo de células Vero**

Para el cultivo de estas células se utilizaron botellas T25 con medio RPMI-1640 con L-glutamina (2mM), suplementado con bicarbonato de sodio 2,5 g/L, 5% SFB y una alternancia periódica de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina o 25 µg/mL de gentamicina). Las botellas de cultivo fueron incubadas en estufa a 37°C con 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) atmosférico.

##### **2.4.2. Infección de células Vero con tripomastigotes**

A partir de un pool de células Vero expandidas en botellas T25 en un volumen final de 5 ml de RPMI-5%SFB, se realizaron varios lavados con

PBS 1X estéril a fin de proceder a infectar las células con tripomastigotes de la cepa VD. Si bien lo ideal es que la relación célula:parásito sea alrededor de 1:5, en este paso no se realizan conteos a fin de dar inicio al ciclo replicativo de los parásitos. Tras 24 horas de incubación se realizó un lavado con PBS 1X estéril para eliminar los parásitos que no ingresaron a las células.

A partir de este momento se realiza un control diario por observación directa de las botellas en el microscopio invertido, a fin de verificar el estado de las células Vero infectadas. El ciclo que inicia, con la infección de los tripomastigotes, pasando por la fase replicativa intracelular (amastigote) hasta la ruptura de la célula hospedadora por acción de los nuevos tripomastigotes, tiene una duración variable de entre tres y cinco días aproximadamente.

### **2.4.3. Purificación de tripomastigotes de cultivo**

Se tomó el medio de las botellas, conteniendo los parásitos emergidos de las células Vero, y se lo centrifugó a 200g durante 5 minutos, el sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 1000g durante 20 minutos, el pellet obtenido de cada botella, que contiene los parásitos, se resuspendió en 1 ml de RPMI-5%SFB. De esta resuspensión, se tomaron 10  $\mu$ l y se realizó el conteo de parásitos móviles en cámara de Neubauer, la fórmula empleada para la obtención del número de parásito por ml, se encuentra descrita en la sección 2.3.2.

### **2.4.4. Ensayo de metabolismo parasitario**

Se sembraron  $1.10^6$  tripomastigotes por pocillo de placa de 96 pocillos en un volumen final de 100  $\mu$ l de RPMI-5%SFB sin rojo fenol ( $5.10^6$  parásito/ml), para ser expuestos a diferentes concentraciones de BNZ.

Se emplearon soluciones de BNZ con diferentes concentraciones, dispensándose por pocillo 100  $\mu\text{l}$  a fin de lograr concentraciones finales de BNZ de 1, 5, 10 o 20  $\mu\text{M}$ , la placa fue incubada en estufa a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. A modo de control, se sembraron pocillos con tripomastigotes pero sin BNZ, y pocillos con RPMI solamente. La curva de calibración fue construida directamente en la placa. Finalizada la incubación las muestras fueron extraídas con solución C y centrifugadas a 14246g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes fueron conservados a -70°C hasta su utilización.

### **2.4.5. Cuantificación de BNZ y búsquedas dirigidas de metabolitos de BNZ**

Para la cuantificación de BNZ se empleó el método descrito previamente (Sección 2.1.2.) y las búsquedas dirigidas se basaron en los hallazgos de los metabolitos identificados en orinas humanas (Sección 2.1.3.).

### **2.5. Estudio retrospectivo y exploratorio de biomarcadores predictores de reacciones adversas**

Este estudio fue concebido en el contexto de una colaboración con Instituto de Investigación del Centro de Salud de la Universidad de McGill (Research Institute of the McGill University Health Centre/National Reference Centre for Parasitology) en Montreal, Canadá.

El objetivo de esta colaboración fue llevar a cabo un estudio exploratorio retrospectivo para la identificación de biomarcadores séricos predictivos de reacciones adversas de BNZ y NFX, respectivamente, mediante proteómica. Se realizó un estudio preliminar de casos y controles

utilizando muestras de la seroteca del Servicio de Parasitología y Chagas del HNRG.

### 2.5.1. Criterio de selección de muestras

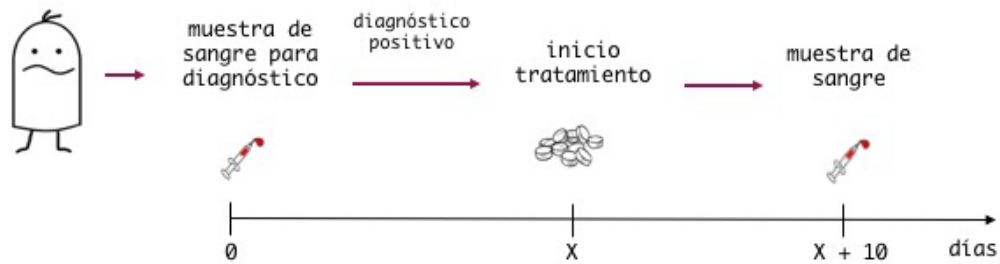
Mediante las historias clínicas se hizo una preselección de pacientes adultos con enfermedad de Chagas que hubiesen realizado el tratamiento con una de las drogas y que hayan sufrido reacciones adversas (RA) y pacientes que hayan completado el tratamiento sin presentar RA. En el caso de tratamiento con BNZ se empleó como criterio de selección la presencia de RA relacionados a eventos cutáneos como exantema, urticaria, prurigo y rash entre otros. Para el tratamiento con NFX, el criterio de selección se basó en la presencia de eventos relacionados al sistema nervioso: anorexia, excitación psicomotriz, cefalea y pérdida de peso entre otros.

En la Figura MyM3, se halla representado el esquema de muestreo utilizado en el Servicio de Parasitología y Chagas del HNRG para el diagnóstico y seguimiento de pacientes a corto plazo. Brevemente, se realiza una extracción de sangre para realizar el diagnóstico y entre los 10 y 15 días se obtiene el resultado, frente a un diagnóstico positivo se da inicio al tratamiento con BNZ o con NFX y alrededor de los 10 días de iniciado el tratamiento se citan los pacientes para el primer control tomándose una nueva muestra de sangre. Muchas veces, durante el primer control los pacientes presentan RA, estos suelen ser resueltos mediante el empleo de medicación específica, como es el caso de los corticoides, o dependiendo de su gravedad pueden requerir la suspensión del tratamiento.

De todas y cada una de las muestras obtenidas a lo largo del proceso, se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$  entre 100 y 400  $\mu\text{l}$  de suero que pasarán a formar parte de la seroteca del servicio.



Las muestras utilizadas para este proyecto consistieron en muestras obtenidas de la seroteca del servicio, de pacientes que durante el tratamiento no presentaron RA, y muestras de paciente que durante el tratamiento presentaron RA, de estos últimos también se utilizaron muestras previas, tomadas inicialmente para el diagnóstico. Este esquema fue repetido para tratamientos con BNZ o con NFX respectivamente.



**Figura MyM3.** Esquema de muestreo de sangre para pacientes con diagnóstico positivo de Chagas.

En total se seleccionaron 24 muestras, 12 muestras de pacientes adultos tratados con BNZ y 12 muestras de pacientes tratados con NFX. Las muestras (para cada droga) fueron divididas en tres grupos:

- grupo “sin RA”: muestras de pacientes, que no presentaron RA, tomadas durante el tratamiento (N = 4)
- grupo “con RA”: muestras de pacientes, que presentaron RA, tomadas durante la manifestación de los mismos (N = 4)
- grupo “pre-tratamiento”: muestras pre-tratamiento de pacientes que sufrieron RA (N = 4)

Cabe destacar que las muestras de reacciones adversas pre-tratamiento y durante tratamiento, son muestras pareadas, ya que pertenecen al mismo individuo en diferentes momentos.

### 2.5.2. Colección de muestras

Las 24 muestras fueron sembradas en tarjetas Whatmann (Protein Saber 903) con la técnica DPS (*Dried Plasma Spots* o Punto de Plasma Secado) basada en colocar un cierto volumen de plasma sobre el papel de la tarjeta y dejar que se seque por contacto con el aire. De esta forma, las muestras son fácilmente transportables y al momento de ser utilizadas son reconstituídas. Por cada grupo se sembraron 4 spots (o gotas) de 50  $\mu$ l cada una.

### 2.5.3. Análisis de muestras por proteómica

#### 2.5.3.1. Extracción de muestras en papel

Para la extracción del plasma en papel, se cortó de cada muestra un spot entero, correspondiente a 50  $\mu$ l, y se lo incubó con 500  $\mu$ l de solución tampón D en vórtex a temperatura ambiente durante 3 horas. Finalizada la incubación se procedió a cuantificar proteínas totales de cada muestra mediante un kit comercial por método BCA.

#### 2.5.3.2. Top-down

La técnica de “Top-down” (“*de arriba hacia abajo*”) permite el análisis e identificación de proteínas intactas sin necesidad de digestión enzimática, por medio de la separación de matrices complejas (por ej, suero) por HPLC y análisis por MS de alta resolución.

De cada muestra extraída se tomó el volumen correspondiente a 20 µg de proteínas totales y se lo llevó a 100 µl con PBS 1X, luego se realizó una extracción en fase sólida, a fin de purificar eliminando impurezas, en columnas pequeñas de sílica (C4). Inmediatamente después de la purificación se agregan 40 µl de acetonitrilo 0.1% ácido fórmico y se sonicó durante 10 minutos, finalmente se realiza una centrifugación a 10.000g, 4°C, durante otros 10 minutos.

El producto obtenido contiene las proteínas intactas, que fueron analizadas por UHPLC-ESI-QTOF.

Brevemente, las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: la fase móvil A consistió en agua con ácido fórmico 0.1% y la B en acetonitrilo con ácido fórmico 0.8%, la corrida por gradiente fue de 95% a 5% de A en 60 minutos. Se utilizó una columna C4, flujo de 125 µl/min y volumen de inyección 10 µl conteniendo 10 µg de proteína total. La cantidad de proteína a inyectar se definió tras realizar varias pruebas y hallar el equilibrio entre cantidad de proteoformas halladas y carry over (proteínas que quedan en la columna y contaminan la siguiente muestra), a mayor cantidad de proteína total inyectada en el equipo, mayor cantidad de proteoformas detectadas pero también mayor carry over. Además, para evitar este fenómeno, se realizaron lavados de columna de 60 minutos entre cada muestra.

A fin de seleccionar picos candidatos que serán sometidos a MS/MS para luego realizar la identificación de proteínas, se extrajeron los datos de los cromatogramas obtenidos por MS utilizando el software BioTools (Bruker Daltonics BioTools 3.2, Bruker, Bellirica, MA). Dado que las proteínas pueden protonarse en más de un sitio debido a los grupos amino de los aminoácidos, que son altamente protonables, se suele hallar más de un ion que corresponde a la misma proteína, es decir, la misma proteína puede encontrarse mono o multi protonada, lo que produce que

para igual masa se obtengan diferentes relaciones masa/ carga. Para hallar la masa monoisotópica de cada proteína, en donde la relación masa/carga es masa/1, se aplicaron algoritmos disponibles en el software Biotoools. En este paso se obvia la albúmina, esta no se analiza debido a su alto peso molecular que requiere un algoritmo diferente para la asignación de masa monoisotópica.

Una vez extraídos los datos y analizados los cromatogramas MS, se compararon los picos entre los distintos grupos y aquellos que presentaron diferencias significativas (test t de Student), fueron sometidos a MS/MS. Los patrones de fragmentación de cada ion fueron analizados con el software Mascot (Mascot Search Engine server, versión 2.2.4 (Matrix Science, London, UK), y contrastados contra bases de datos humanas (Uniprot) con los siguientes parámetros: análisis "Top-Down", sin digestión enzimática, y tolerancia a péptidos y fragmentos establecida en 15 ppm y 0,05 Da, respectivamente.

#### 2.5.3.2. Bottom-up

La técnica de "Bottom-up" ("*de abajo hacia arriba*"), es otro enfoque ampliamente utilizado en proteómica, que requiere de la digestión previa de las proteínas en fragmentos peptídicos, por medio de enzimas, para poder llevar a cabo el análisis.

Para este análisis, se toma por cada muestra el volumen necesario que contenga 80 µg de proteínas totales y se lleva a 50 µl con ABC, luego se agregaron 3 µl de DTT 0.1M y se incubó a 70°C por 30 minutos. Finalizada la incubación se descendió de 70°C a temperatura ambiente y se adicionaron 3 µl de IAM 0.3M para incubar durante 30 minutos más en cuarto oscuro. El DTT es un agente reductor de tioles mientras que el IAM alcaliniza y se une a los grupos tioles reducidos, el objetivo es

evitar la formación de puentes disulfuro una vez que las proteínas están desnaturalizadas.

El siguiente paso consistió en agregar 10  $\mu$ l tripsina a cada tubo (40:1, proteínas totales:tripsina) y 24  $\mu$ l de ABC, e incubar a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se purificaron las muestras mediante una extracción en fase sólida en columnas de sílica (C18) y luego, se agregan 40  $\mu$ l de acetonitrilo 0.1% ácido fórmico y se sonicó por 10 minutos. Tras la sonicación, se centrifugó a 10000g, 8°C, durante otros 10 minutos. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las mismas utilizadas para Top Down.

En este caso la medición de las muestras no es en dos etapas como en el enfoque Top-down, es decir, no se seleccionan picos candidatos a ser sometidos a MS/MS tras haber de analizado el espectro MS, sino que durante la misma corrida cromatográfica, los picos de MS que superen un cierto umbral de intensidad, directamente son sometidos a MS/MS. Los resultados fueron analizados con el software MaxQuant Free Quantification que identifica todos los péptidos provenientes de una proteína para utilizarlos como una pseudo cuantificación que es relativa al control (sin RA).

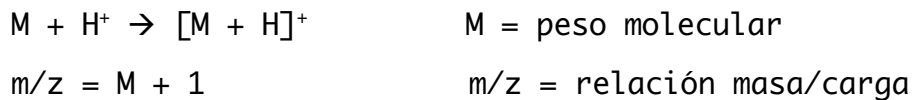
# RESULTADOS

## 1. Detección de BNZ e identificación de sus principales metabolitos en orina humana

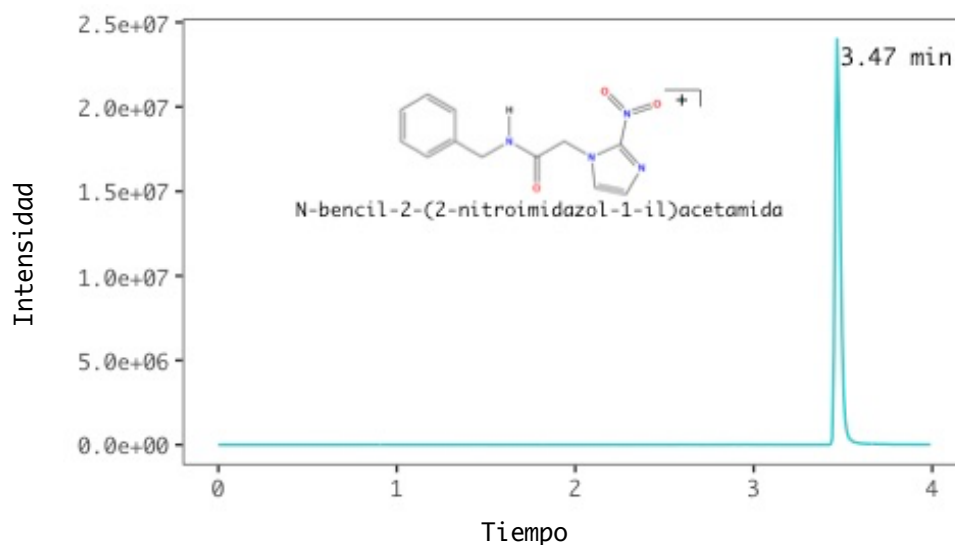
### 1.1. Detección y cuantificación de BNZ

Tras realizar la búsqueda dirigida de BNZ por UHPLC-ESI-QqQ, se logró detectarlo en todas las muestras de orina (N = 4) verificando su ausencia en los controles.

Para todos los iones obtenidos producto de escaneos por UHPLC-ESI-QqQ, se asumió el tipo de ion generado por protonación con  $z = 1$ :

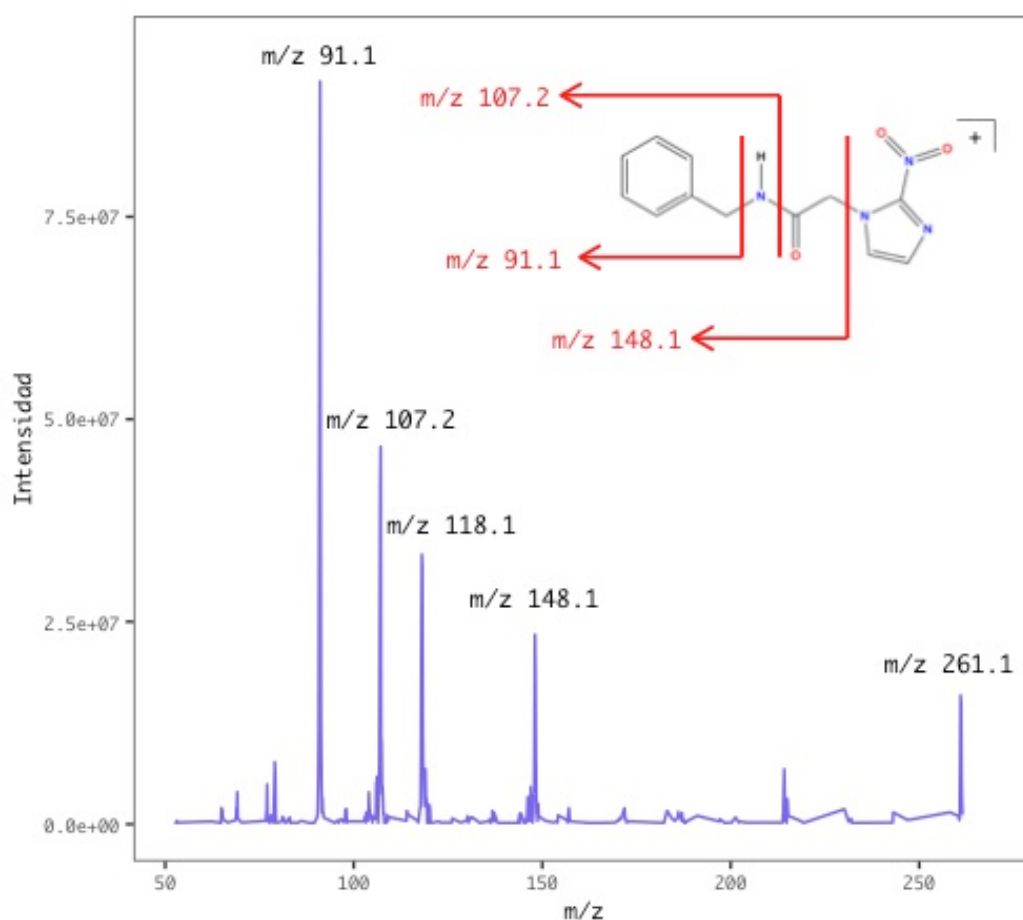


El peso molecular del BNZ es 260 g/mol, por lo que al hallarse ionizado, específicamente protonado, se lo detectó con una relación de  $m/z$  de 261.1 u (u = unidad de masa atómica) y con un tiempo de retención de 3.47 min (Figura R1).



**Figura R1.** Cromatograma de BNZ y estructura de la molécula.  
Eje x: Tiempo en minutos.

Luego de someter el BNZ al análisis MS/MS se obtuvo el patrón de fragmentación de este con los iones característicos generados por la ruptura de la molécula (Figura R2). Si bien la mayoría de los picos del espectro pudieron ser identificados como fragmentos del BNZ, en el caso del ion  $m/z$  118.1, no se logró asignar una estructura con certeza, asumiendo que el mismo corresponde a algún fragmento con una posterior modificación, por ejemplo, la pérdida de una molécula de agua.



**Figura R2.** Espectro de masa con patrón de fragmentación de BNZ. Cada fragmento representado por un pico en el espectro, fue deducido de la molécula de BNZ mediante diferencia de masas.



Para la cuantificación se utilizó el método de escaneo por MRM, seleccionando las dos transiciones más de mayor intensidad y estabilidad ( $m/z$  261.1 – 91.1 y  $m/z$  261.1 – 107.2). Los resultados pueden observarse en la Tabla R1, así como también el porcentaje de eliminación de droga en orina que se calcula como:

$$\frac{\text{Volumen de orina (L)} * \text{Concentración de BNZ en orina (mg/L)}}{\text{Dosis diaria (mg)}}$$

El valor obtenido, permite dar una idea del porcentaje de BNZ eliminado diariamente en el volumen de orina total de 24 horas.

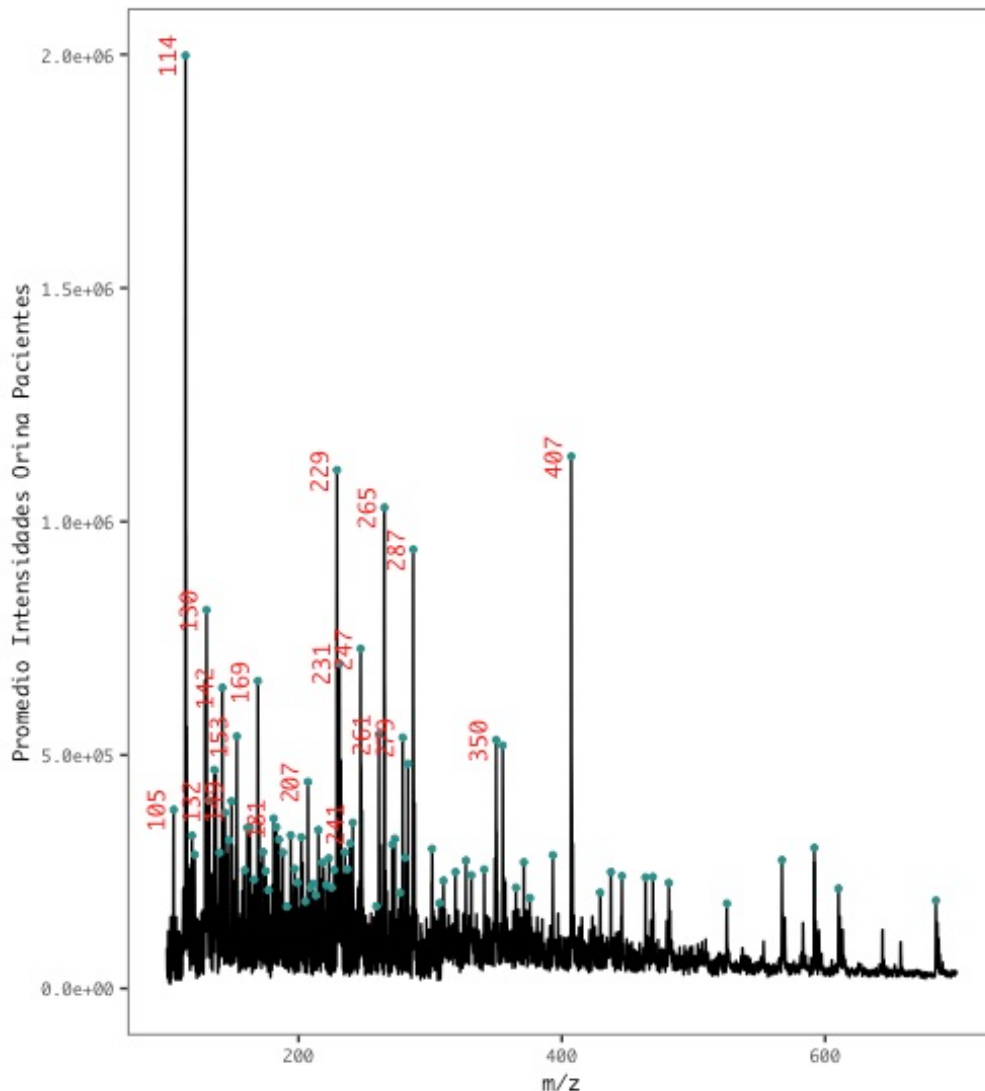
Sexo	Vol orina (L)	Peso paciente (kg)	Dosis diaria (mg)	[BNZ] (mg/L)	% eliminado
femenino	2.0	74.50	400	0.11	0.06%
femenino	1.1	57.50	400	1.96	0.54%
femenino	1.9	104.00	400	2.58	1.23%
masculino	2.0	61.80	400	3.70	1.85%
media	1.75	74.45	400	2.09	0.92%

**Tabla R1.** Concentración de BNZ en mg/L ( $\pm 0.05$ ) cuantificada en orina de pacientes con enfermedad de Chagas en estadio crónico. Cada fila representa una muestra de orina perteneciente a un paciente, siendo la última fila la media.

## 1.2. Identificación de los principales metabolitos de BNZ

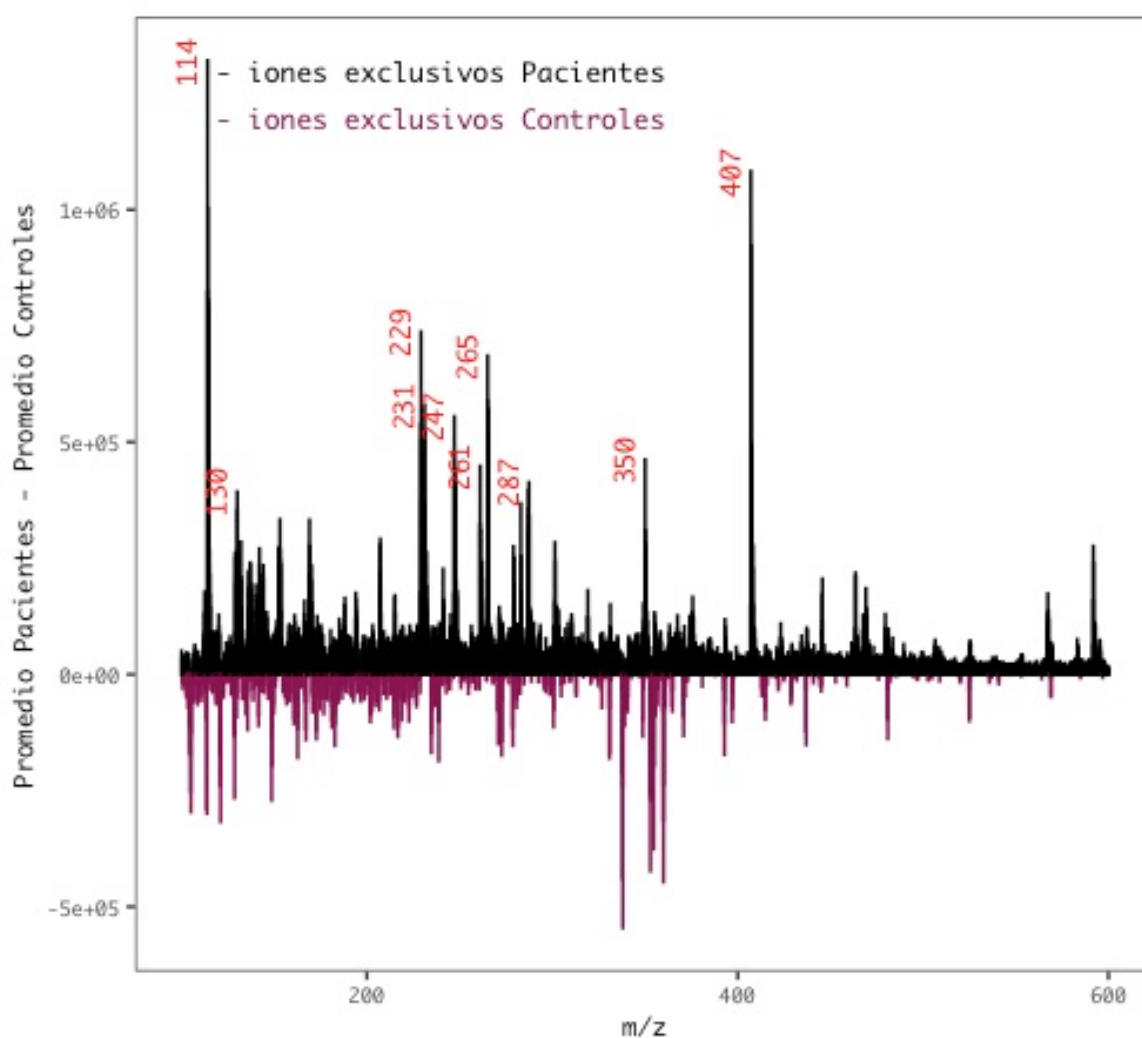
El análisis exploratorio mediante escaneo EMS, sin búsquedas dirigidas, en orina de pacientes bajo tratamiento con BNZ, sugirió numerosos potenciales metabolitos. En la Figura R3, se puede observar el promedio de los espectros EMS de orina de pacientes, siendo los

puntos verdes los máximos locales de intensidad y figurando el valor  $m/z$  asociado de aquellos que superaron cierto umbral de intensidad. La selección del umbral de intensidad en el caso de la Figura R3 se debe exclusivamente a la limitación visual que cercena la cantidad de picos a identificar. Entre los picos de mayor intensidad también se puede observar el estándar interno utilizado (NFX) con relación  $m/z$  287.



**Figura R3.** Promedio de espectros EMS de orinas de pacientes bajo tratamiento con BNZ. Se consideró una relación señal/ruido de 3, es decir, para considerar un pico se determinó que su intensidad debería ser al menos 3 veces mayor al ruido.

A fin de determinar cuáles de los picos con alta intensidad corresponderían a metabolitos de BNZ, se contrastaron los espectros EMS de orina de pacientes y controles. La Figura R4 describe el resultado de la sustracción del espectro EMS medio de pacientes con el espectro EMS medio de controles. De esta forma, se encontraron los siguientes picos con alta intensidad:  $m/z$  114, 130, 229, 231, 247, 265, 350 y 407, con  $z = 1$ .



**Figura R4.** Resultado de espectros de masa promedio EMS de orinas sustraídos (paciente – control). Los valores de intensidad positivos, en color negro, corresponden a iones presentes solo en orinas de pacientes, mientras que los valores de intensidad negativos, en color bordó, corresponden a iones presentes solo en orinas de controles.

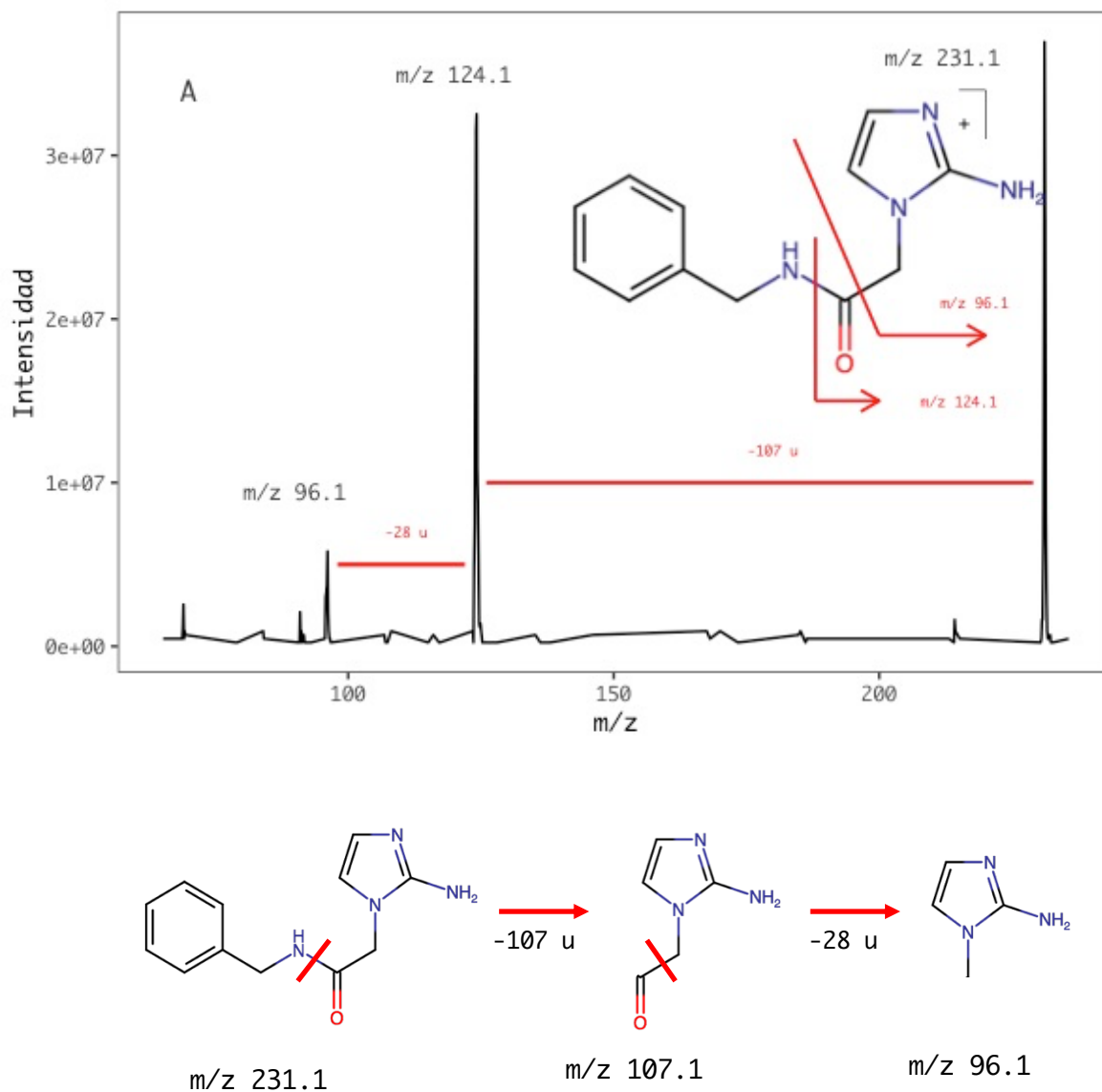
Una gran parte de estos potenciales metabolitos de BNZ fueron identificados como tales tras realizar búsquedas dirigidas con análisis de patrones de fragmentación y escaneos por pérdidas neutras.

En el caso de los metabolitos, total y parcialmente nitro reducidos, si bien fueron fácilmente identificados por datos bibliográficos ( $m/z$  231.1 y  $m/z$  247.1) en los escaneos EMS, fue necesario chequear su identidad, a fin de descartar, que fuesen otros iones de igual relación  $m/z$ , pero no asociados a metabolitos de BNZ.

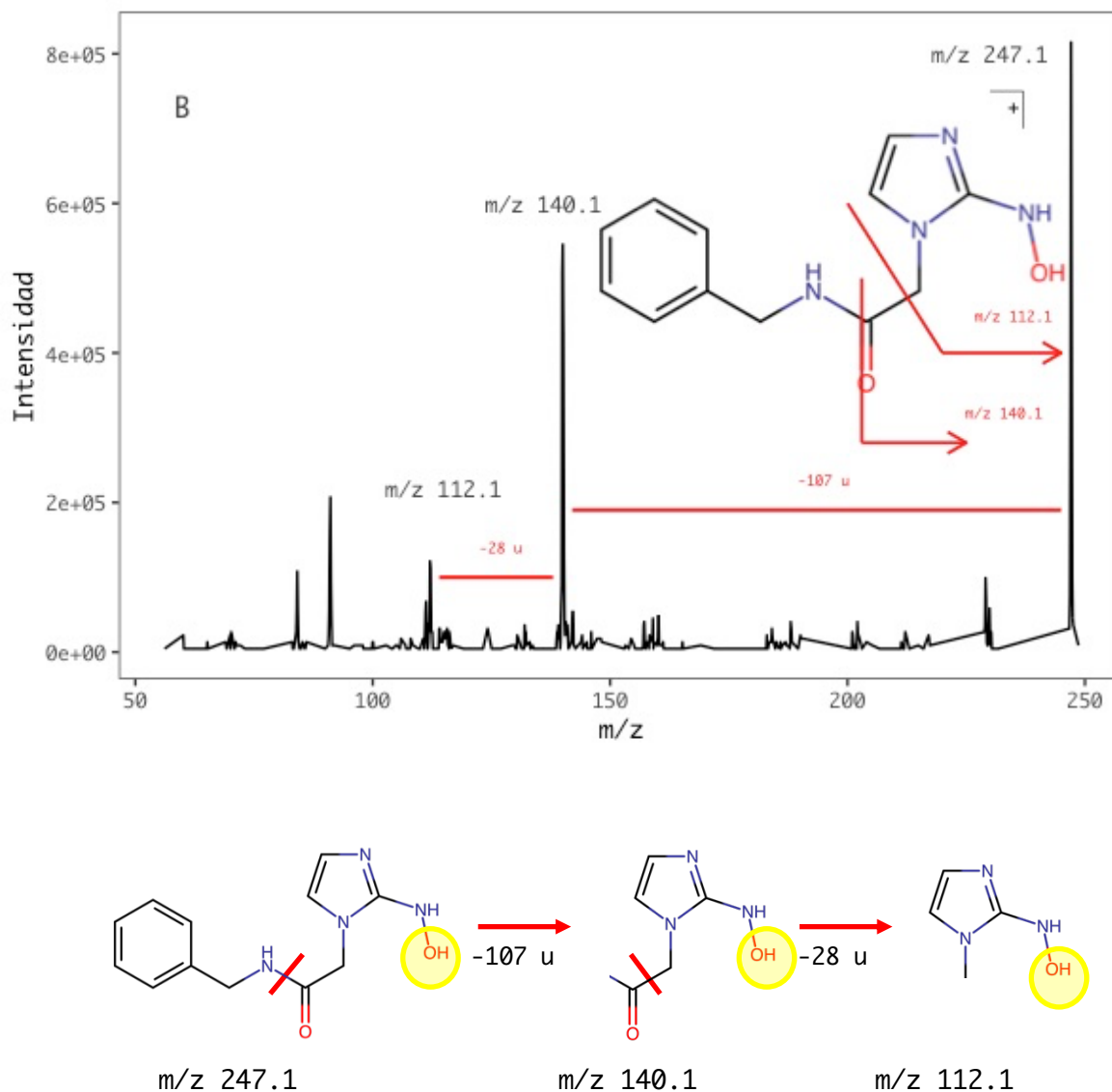
Bajo este concepto se realizaron búsquedas dirigidas, con los correspondientes análisis MS/MS. Los resultados permitieron caracterizar los patrones de fragmentación de cada uno y chequear su identidad mediante la asociación de los picos mas importantes del espectro con fragmentos de la molécula, de forma lógica, en función del peso molecular (Figura R5).

La diferencia en el peso molecular entre ambos metabolitos, que es de 16 u, correspondería al átomo de oxígeno aún presente en el parcialmente nitro reducido. Ambos metabolitos sufrirían rupturas en los mismos enlaces, fragmentándose de igual forma, por lo que sus productos de fragmentación conservarían la diferencia de 16 u.

En este proceso se descartaron iones que tras el análisis por MS/MS no pudieron ser identificados como productos del metabolismo de BNZ como es el caso de  $m/z$  114, 130 y 229.



**Figura R5A.** Espectros de masa con patrones de fragmentación de metabolito totalmente nitro reducidos ( $m/z$  231.1), debajo se hallan detalladas las fragmentaciones con las pérdidas de masa asociadas y los iones obtenidos. Cada fragmento representado por un pico en el espectro, fue deducido del metabolito mediante diferencia de masas.



**Figura R5B.** Espectros de masa con patrones de fragmentación de metabolito parcialmente nitro reducidos (m/z 247.1), debajo se hallan detalladas las fragmentaciones con las pérdidas de masa asociadas y los iones obtenidos. Cada fragmento representado por un pico en el espectro, fue deducido del metabolito mediante diferencia de masas.

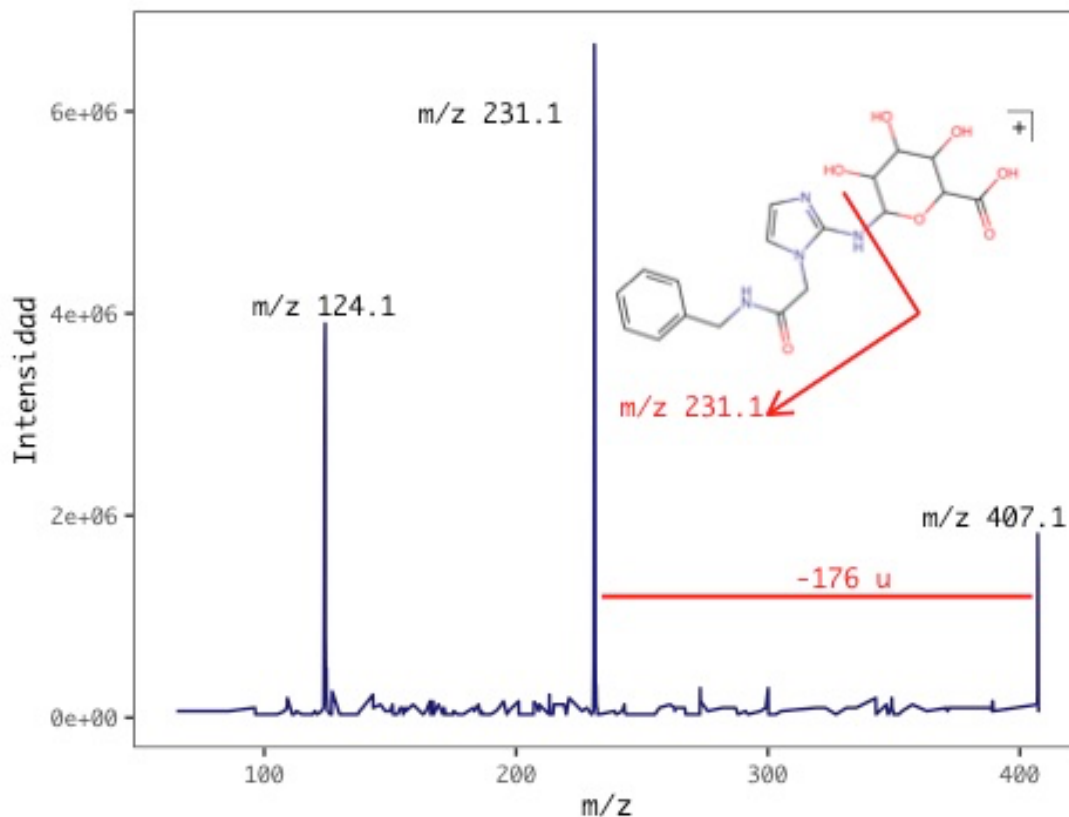
En amarillo se halla resaltado el sustituyente con el oxígeno que adiciona 16 u (más que el m/z 231.1) al m/z 247.1 y sus fragmentos.

La presencia de m/z 207.1 y m/z 265.1, fue chequeada de igual modo que para los metabolitos nitroreducidos: búsquedas dirigidas seguidas de análisis MS/MS. Ambos son metabolitos de Fase I, el de mayor

peso molecular sería un producto con el anillo nitro pirrol reducido y doblemente sustituido con hidroxilos. En el caso del de menor peso molecular, el mismo sería un producto de la ruptura del anillo nitro pirrol.

La aplicación del método de escaneo NL permitió identificar metabolitos conjugados con ácido glucurónico. Se planteó la posibilidad de hallar la molécula de BNZ directamente conjugada con ácido glucurónico, pero esta hipótesis fue descartada al verificarse la ausencia de dicho complejo en las muestras. Se identificaron los siguientes metabolitos:  $m/z$  407.1, previamente observado en las búsquedas no dirigidas, correspondiente al producto de conjugación con ácido glucurónico del metabolito  $m/z$  231.1 y con menor intensidad  $m/z$  423.1 correspondiente a  $m/z$  247.1 también conjugado con ácido glucurónico. Tras el análisis por MS/MS se confirmó la identidad de ambos mediante los patrones de fragmentación. En la Figura R6 se presenta el espectro con el patrón de fragmentación del  $m/z$  407.1.

Mediante el mismo método de escaneo, pero utilizando una pérdida neutra de 119 u, se detectó un producto metabólico conjugado con cisteína con relación  $m/z$  350.1. Los resultados del análisis MS/MS permitieron concluir que es el resultado de la conjugación de cisteína con el metabolito  $m/z$  231.1.



**Figura R6.** Espectro de masa con patrón de fragmentación de metabolito conjugado con ácido glucurónico. Las 176 u representan la pérdida neutra configurada para la detección de conjugados con ácido glucurónico por NL.

Los resultados de la búsqueda dirigida de metabolitos por escaneos Q1 y MRM se halla en la Figura R7 en donde se presentan los principales metabolitos de BNZ, siendo "A" el cromatograma producto del escaneo Q1, búsquedas dirigidas múltiples y en simultáneo, y "B" el cromatograma producto del escaneo por MRM.

Las dos transiciones utilizadas para cada metabolito en el escaneo por MRM se encuentran descritas en la Tabla R2 y fueron definidas luego de analizar el patrón de fragmentación de cada metabolito y seleccionar las dos principales fragmentaciones, que a su vez se hallan asociadas a un mismo tiempo de retención para cada uno. En la



misma tabla, también se describen tres parámetros que fueron puestos a punto para cada transición de cada metabolito: el potencial de desagrupación (DP de Declustering Potencial) y el potencial de entrada (EP de Entrance Potencial), que son tensiones previas a la colisión, y la energía de colisión (CE de Collison Energy) que es la cantidad de energía que reciben los iones precursores a medida que se aceleran hacia el interior de la celda de colisión.

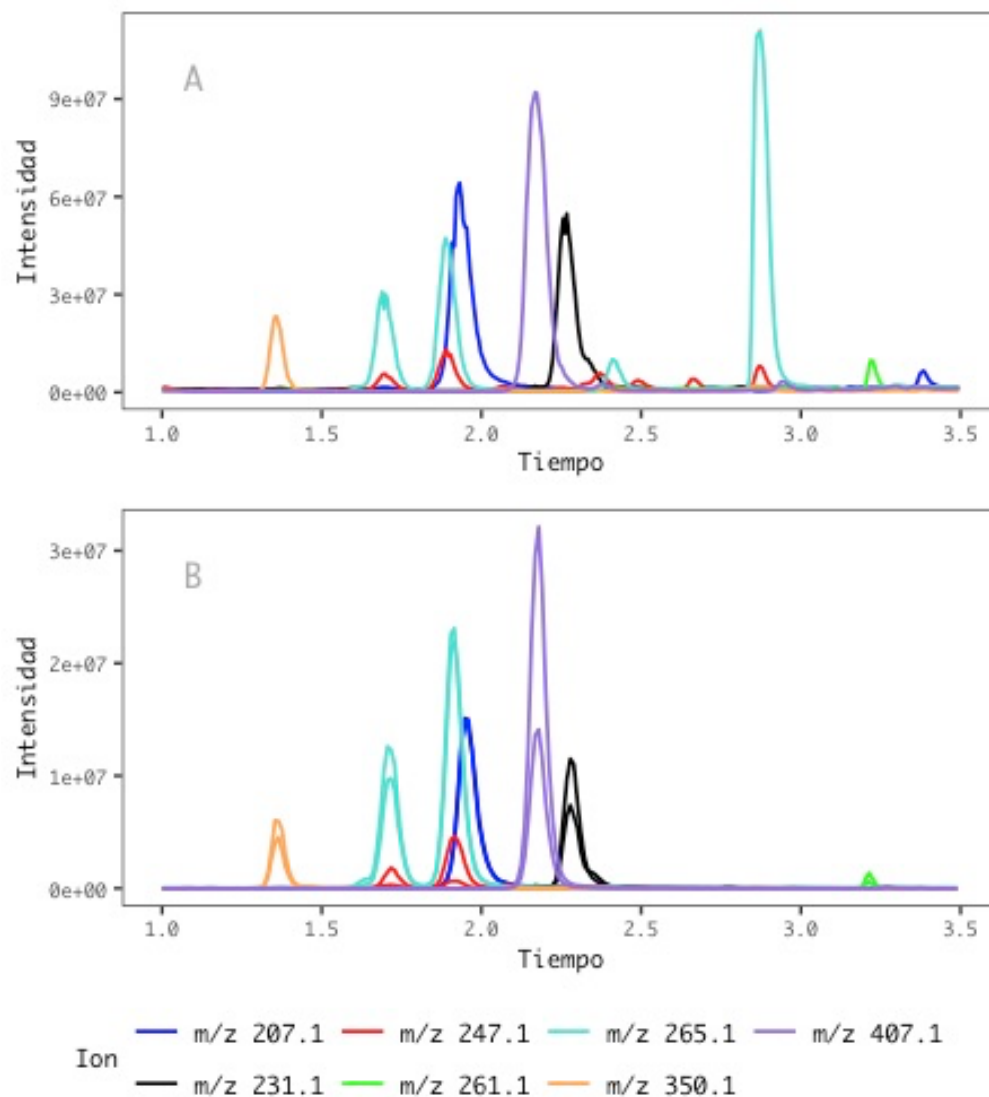
El escaneo Q1 realiza búsquedas dirigidas pero inespecíficas de  $m/z$ , conllevando a la detección de cualquier ion que cumpla con la relación  $m/z$  definida sin que necesariamente estén relacionados a metabolitos de BNZ. En la Figura R7 A se observa que  $m/z$  207.1, 247.1 y 265.1 describen varios picos respectivamente, por lo que a fin de descartar iones no relacionados al BNZ se contrastó el cromatograma con el obtenido por MRM (que para cada metabolito describe dos transiciones a un mismo tiempo de retención, ver Figura R7 B). De esta forma se descartaron picos del cromatograma Q1 con igual relación  $m/z$  que algunos metabolitos, pero con tiempo de retención no coincidente con el espectro MRM, como es el caso de  $m/z$  265.1 que presentó 4 picos en el espectro Q1 (Figura R7 A) pero solo 2 coincidentes en tiempo de retención con el espectro MRM (Figura R5 B). Es decir, a 1.7 min y a 1.9 min se detectaron las transiciones  $m/z$  265.1 –  $m/z$  140.1 y  $m/z$  265.1 –  $m/z$  247.1, por lo que los picos observados en Q1 para  $m/z$  265.1 con otros tiempos de retención no se hallan relacionados al BNZ.

El hecho de que  $m/z$  265.1 presente 2 picos, que sí están relacionados al BNZ, es un fenómeno que podría deberse a isómeros estructurales cuyas estructuras son lo suficientemente diferentes para separarse

cromatográficamente pero su similitud es tal que no permite diferenciarlos mediante análisis por MS/MS. Para m/z 265.1, los dos picos observados podrían deberse a isómeros cis y trans de la molécula. Según el análisis por MRM el metabolito m/z 247.1 describió 2 picos, es decir, a dos tiempos de retención diferentes se detectaron ambas transiciones: a 1.7 min y a 1.9 min se observan las transiciones m/z 247.1 – m/z 112.1 y m/z 247.1 – m/z 140.1). Nuevamente, nos encontraríamos frente a isómeros.

Ion precursor (m/z)-Q1	Ion producto (m/z)-Q3	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)
261.1	91.1	30	6	50
261.1	118.1	30	6	20
207.1	91.1	20	12	35
207.1	100.1	40	12	20
231.1	96.1	70	3	35
231.1	124.1	50	3	25
247.1	112.1	30	12	30
247.1	140.1	70	12	25
265.1	140.1	20	12	25
265.1	247.1	20	12	15
350.1	156.1	90	6	30
350.1	263.1	90	6	30
407.1	124.1	90	10	40
407.1	231.1	90	10	35
423.1	140.1	70	6	45
423.1	247.1	70	6	25

**Tabla R2.** Transiciones y parámetros definidos para el método MRM por ion.

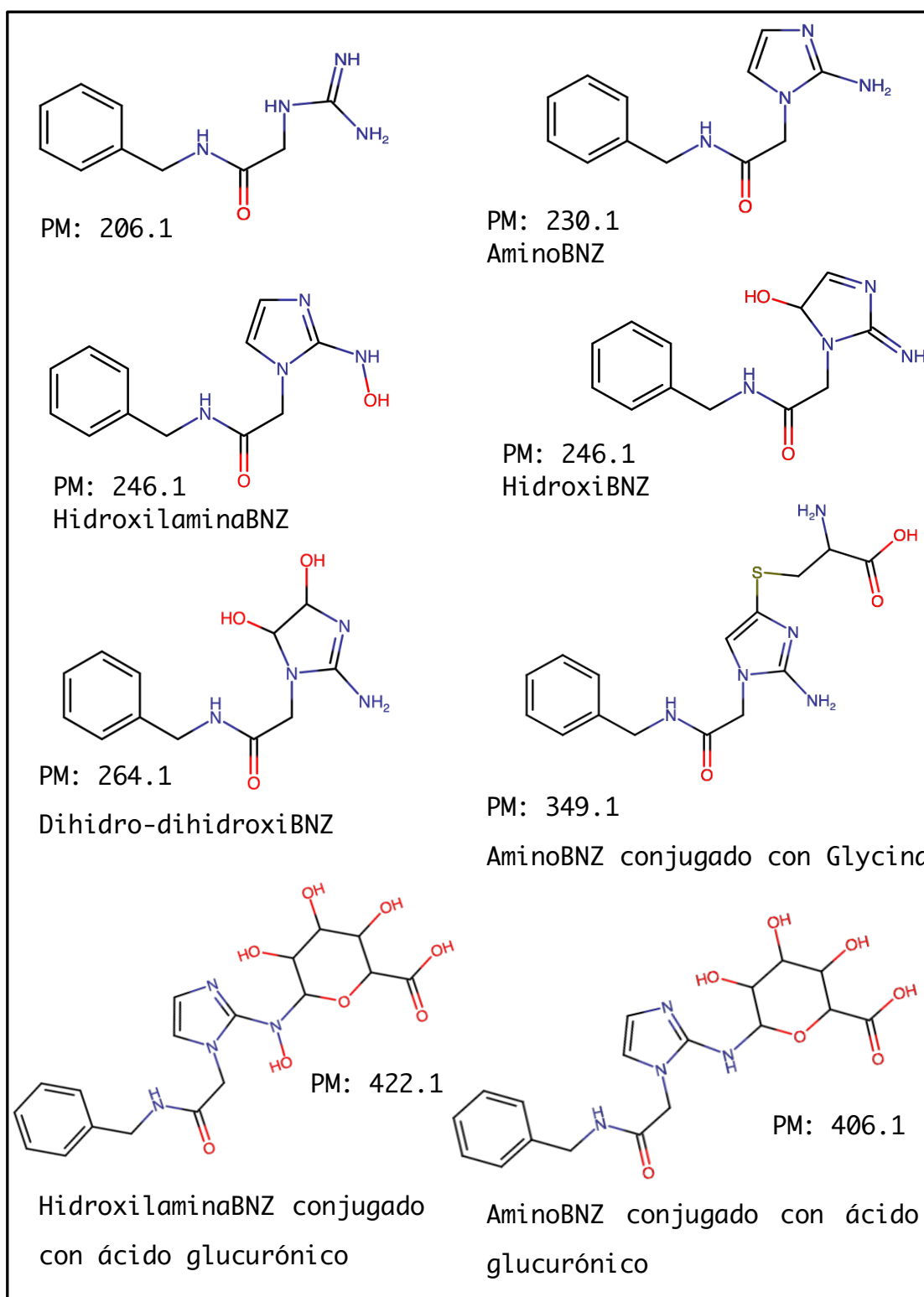


**Figura R7.** Cromatogramas de muestras de orina obtenidos por escaneo Q1 (A) y escaneo MRM (B). En A, cada ion está representado por un color, en B cada color representa las dos transiciones empleadas por ion correspondiéndose los colores entre ambos gráficos. Por ejemplo, en A el color anaranjado representa el ion m/z 350.1, mientras que en B, el mismo color representa las transiciones m/z 350.1 - m/z 263.1 y m/z 350.1 - m/z 156.1. En A se observan las detecciones de búsquedas dirigidas para los iones m/z 207.1, 231.1, 247.1, 261.1, 265.1, 350.1 y 407.1, por lo tanto, se detectan todos aquellos iones con las relaciones masa-carga definidas. En B se detectaron las transiciones específicas seleccionadas para cada ion de interés (ver Tabla R2). Eje x: Tiempo en minutos.

Los metabolitos fueron identificados mediante escaneos Q1 y MRM debido a que, si bien la información obtenida por MRM es más precisa y sensible que la obtenida por Q1, por MRM no se pueden comparar intensidades de diferentes iones ya que los parámetros del método se ajustan a cada ion para que su intensidad sea máxima (ver Tabla R2). El metabolito conjugado con ácido glucurónico,  $m/z$  407.1, fue el de mayor intensidad, seguido por  $m/z$  231.1 y  $m/z$  207.1, mientras que los de menor intensidad fueron  $m/z$  247,  $m/z$  350.1 y  $m/z$  423.1, variando sus intensidades entre las muestras y siendo  $m/z$  423.1 casi indetectable en algunas muestras (ver Figura R7 A).

Los metabolitos más abundantes y representativos ( $m/z$  231.1,  $m/z$  207.1,  $m/z$  247.1,  $m/z$  265.1,  $m/z$  407.1) fueron confirmados por espectrometría de masa de alta resolución (UHPLC-ESI-QTOF), mediante el servicio prestado por el Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION), Conicet. Esta técnica al contar con mayor precisión y exactitud en la detección de relación  $m/z$  (la precisión de la medición es de cuatro decimales), permitió una segunda verificación de las respectivas identidades planteadas para cada pico.

En la Figura R8 se hallan las posibles estructuras moleculares para cada metabolito; en la Tabla R3, pueden observarse las posibles fórmulas moleculares de cada producto metabólico identificado, con el método asociado de detección/identificación y el origen metabólico (Fase I o II del metabolismo).



**Figura R8.** Posibles estructuras moleculares de metabolitos de BNZ. Notar que para el metabolito de PM: 246.1 habría dos potenciales estructuras. De la misma manera para el metabolito de PM: 406.1, debe considerarse la posibilidad de que sea hidroxilaminaBNZ conjugado con ácido glucurónico. PM: Peso molecular.

Peso Molecular	Fórmula Molecular	Fase I/II	Método	Confirmados por alta resolución*
206.1	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O	I	Búsqueda dirigida, MS/MS	Sí
230.1	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O	I	Búsqueda dirigida, MS/MS	Sí
246.1	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	I	Búsqueda dirigida, MS/MS	Sí
264.1	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	I	Búsqueda dirigida, MS/MS	Sí
349.1	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	II	NL (119 u), MS/MS	No
406.1	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	II	NL (176 u), MS/MS	Sí
422.1	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	II	NL (176 u), MS/MS	No

**Tabla R3.** Fórmulas moleculares de los productos metabólicos identificados. \* Valores de masa confirmados por espectrometría de masa de alta resolución UHPLC-ESI-QTOF.

## 2. Metabolismo mamífero *in vitro*

### 2.1. Cuantificación de proteínas por método de Bradford en microplaca

Para cada purificación microsomal de hígado se construyó una curva de calibración con BSA a fin de realizar la cuantificación de proteínas por regresión lineal. Todas las curvas describieron buenos ajustes ( $R^2 > 0.9$ ), los resultados obtenidos para cada purificación pueden observarse en la Tabla R4.

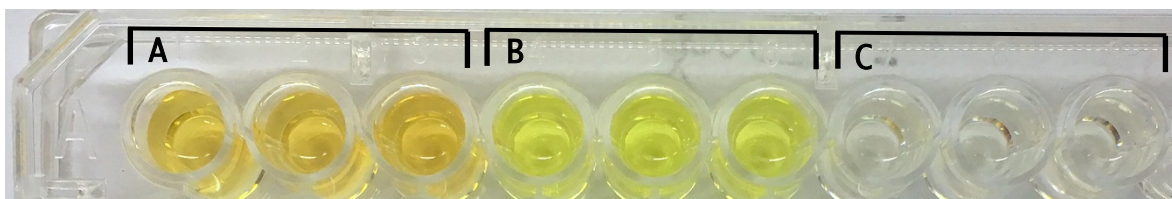
	Lote A	Lote B
Rata	12.16	28.40
Ratón	36.40	18.61
Cerdo	10.22	10.76

**Tabla R4.** Concentración de proteínas totales (mg/ml) medidas por método de Bradford.

## 2.2. Controles de actividad microsomal

### 2.2.1. Determinación de actividad de CYP2E1/CYP3A4 y UGT

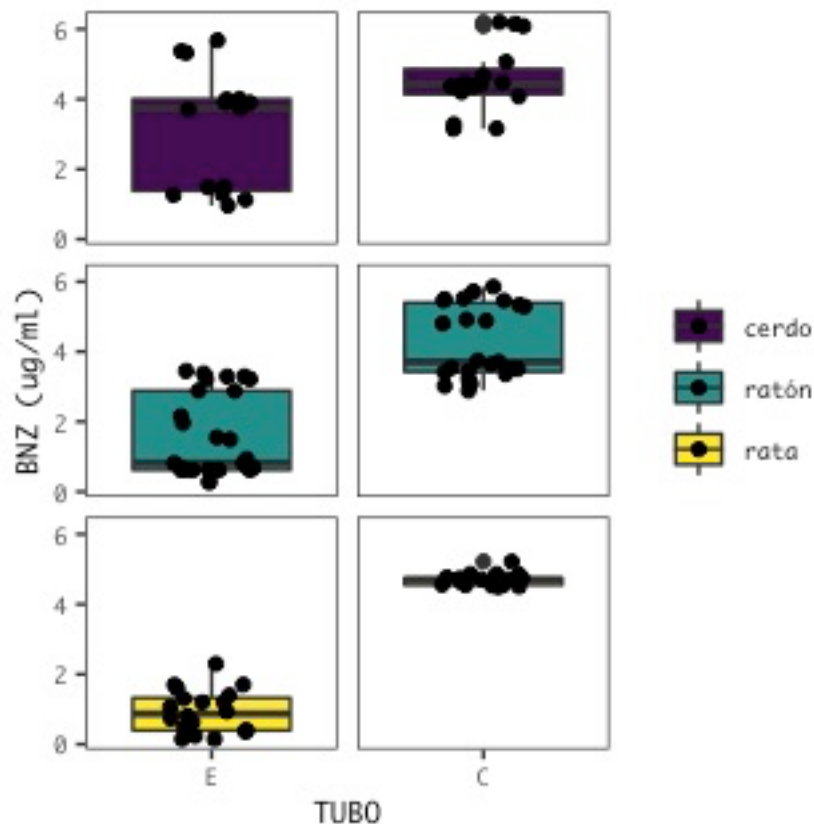
Para cada purificación, este control arrojó resultados positivos ( $p < 0.05$ , test t de Student), demostrando actividad de CYP2E1/CYP3A4 sobre p-NP y verificando la funcionalidad de los microsomas asilados. Para el caso de UGT, que fue llevado a cabo solo para microsomas de cerdo y ratón, se obtuvieron también resultados positivos ( $p < 0.05$ , test t de Student).



**Figura R9.** Fotografía de placa de control de actividad de CYP2E1/CYP3A4 para microsomas de cerdo post incubación. En “A” se incubaron los microsomas de cerdo con NADPH, “B” es el control negativo (sin NADPH) y “C” el blanco. La diferencia de color entre “A” y “B” se debe a la producción de 4-NC.

### 2.3. Ensayos metabolismo *in vitro* de BNZ

Los microsomas hepáticos de todas las especies mamíferas estudiadas (i.e. rata, ratón, cerdo) en el sistema con NADPH, metabolizaron BNZ significativamente, Figura R10 ( $p=2e^{-16}$ , regresión lineal multivariada de efectos mixtos). Si bien ninguna de las variantes microsomales metabolizó completamente el BNZ, incluso a concentraciones altas de NADPH, hubo diferencias en el porcentaje de caída de concentración de droga, siendo los microsomas provenientes de rata los que presentaron mayor actividad metabólica (80%), seguida de ratón (62.8%) y cerdo (36.4%).



**Figura R10.** BoxPlot ensayo metabolismo microsomal. Eje x: Tubo E (Experimental) o C (Control), eje y: Concentración BNZ ( $\mu\text{g/ml}$ ).



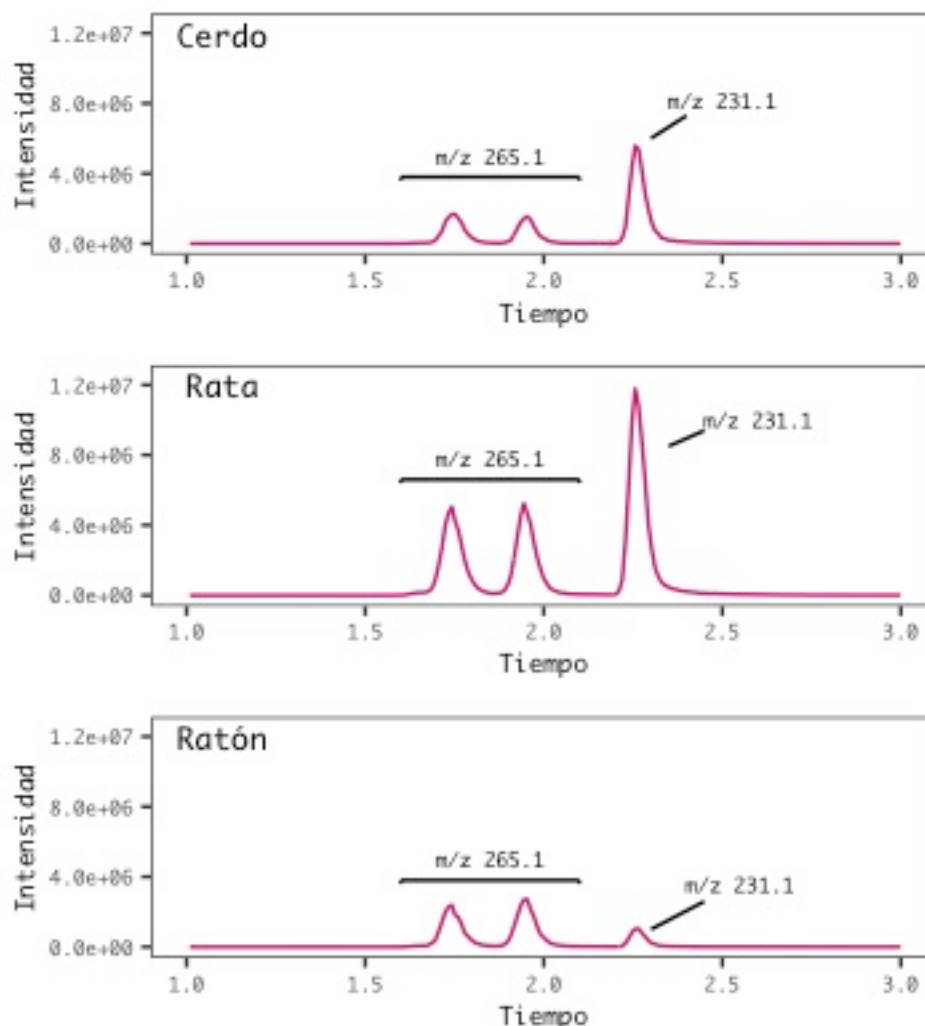
Por otro lado, no se observó decrecimiento en la concentración de BNZ en los sistemas *in vitro* con UDPGA, con ninguna variante microsomal. Mientras que para la incubación con UDPGA y NADPH se observaron resultados similares a los obtenidos con la incubación exclusiva con NADPH.

#### 2.4. Identificación de metabolitos de BNZ

Los productos de biotransformación de Fase I (m/z 207.1, m/z 231.1, m/z 247.1 y m/z 265.1) identificados previamente en orina (Sección 1.2.), fueron detectados en los sobrenadantes de los ensayos incubados con NADPH en las tres especies animales.

Tras analizar las intensidades de cada uno de los metabolitos en los espectros Q1, se hallaron relaciones de intensidad características para los microsomas de cada especie (Figura R11). El metabolito con m/z 231.1 describió la mayor intensidad en los microsomas aislados de cerdo y rata, seguido en intensidad por m/z 265.1. Esta relación es inversa en los microsomas aislados de ratón, siendo el metabolito con m/z 265.1 mayor en intensidad que m/z 231.1. Cabe destacar que al mencionar a m/z 265.1, en realidad se habla de los dos isómeros cuyo comportamiento es igual, es decir, ambos picos presentan intensidad similar.

Tras realizar la búsqueda de conjugados con ácido glucurónico mediante el escaneo NL (Sección 2.1.3.), en los sobrenadantes del sistema con UDPGA y NADPH (que presentó metabolismo de BNZ) no fue posible detectarlos.



**Figura R11.** Cromatogramas obtenidos por Q1, de izquierda a derecha, los primeros dos picos corresponden a isómeros de  $m/z$  265.1 y el tercer pico a  $m/z$  231. Esta figura permite contrastar la producción *in vitro*, mediante el empleo de microsomas hepáticos, de los metabolitos  $m/z$  265.1 y  $m/z$  231.1 para las 3 especies empleadas en el ensayo. La mayor intensidad neta de ambos metabolitos se observó con los microsomas obtenidos de rata. Por otro lado, los resultados de cerdo y rata, describen a  $m/z$  231.1 como el metabolito predominante en intensidad seguido de los isómeros  $m/z$  265.1, mientras que para ratón la relación de intensidades es inversa. Eje x: Tiempo en minutos.

## 2.5. Ensayo de cinética *in vitro* de metabolitos de BNZ

Se detectaron los principales metabolitos descritos previamente y se seleccionaron aquellos que presentaron mayor intensidad en los espectros Q1. Cualitativamente pudo observarse que el primer metabolito en aparecer a los diez minutos fue m/z 231.1, luego se detectaron ambos isómeros m/z 265.1 y finalmente los últimos en aparecer fueron los dos m/z 247.1. Para los iones con isómeros (m/z 247.1 y 265.1), se combinaron ambas intensidades en una sola, a fin de trabajar con la intensidad total del metabolito.

Debido a la ausencia de estándares de metabolitos para construir curvas de calibración y así cuantificar los productos, se realizaron curvas de intensidad de metabolito en función del tiempo. Se observó una tendencia sigmoidea que confirmó la necesidad de ajustar los datos por regresión no lineal, siguiendo un modelo logístico para cada metabolito:

$$y = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

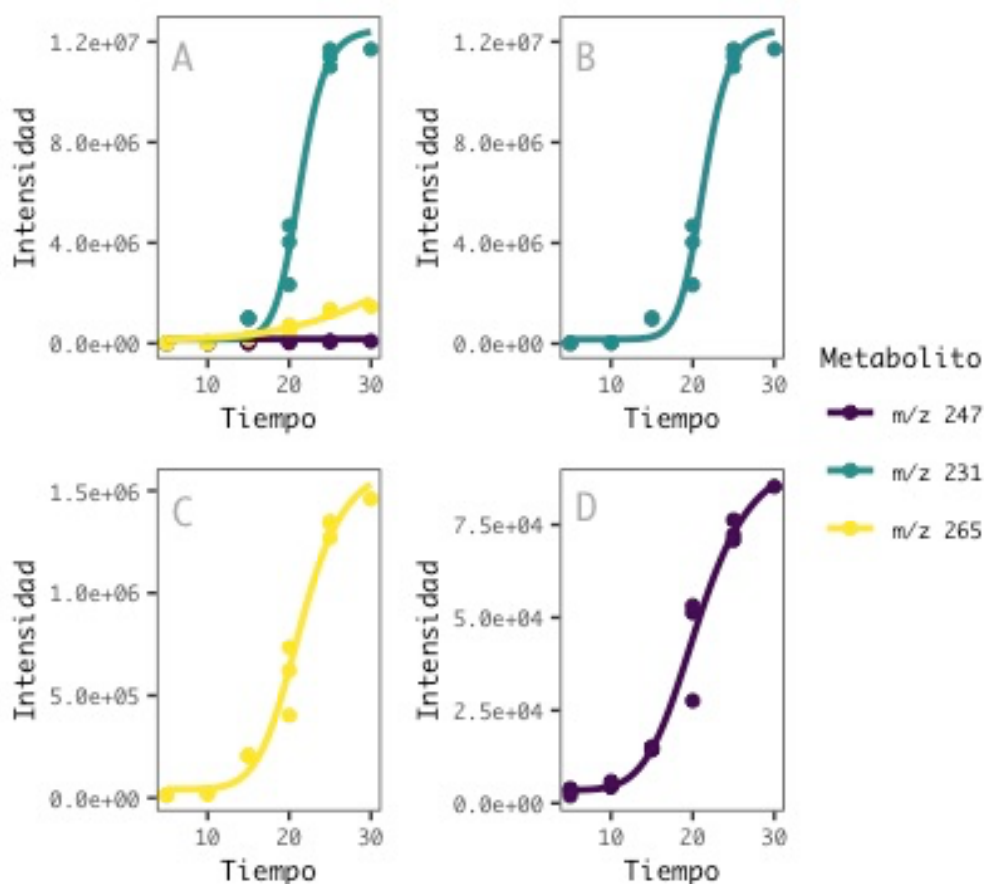
Siendo “y” la intensidad medida del metabolito, “b” la pendiente, “c” el límite inferior de intensidad, “d” el límite superior de intensidad, y por último, “e”, el punto de inflexión de la pendiente o EC50, es decir, el tiempo medio requerido para observar el punto medio de intensidad. Los límites inferior y superior de intensidad (“c” y “d”) fueron fijados para cada metabolito respectivamente.

El modelo ajustó correctamente con valores significativos para todos los metabolitos, los valores obtenidos de parámetros EC50 y pendiente para cada metabolito se hallan en la Tabla R5.

En la Figura R12 se pueden observar las curvas obtenidas para cada metabolito.

Metabolito	EC50 (e)	Pendiente ( b )	p valor
m/z 231.1	21.34	13.77	8.659e-07
m/z 247.1	20.66	6.17	2.764e-07
m/z 265.1	21.38	7.99	3.695e-07

**Tabla R5.** Valores de EC50 (en minutos) y pendiente obtenidos por modelo de regresión logística para cada metabolito.



**Figura R12.** Cinética de metabolitos. "A" curvas obtenidas por regresión logística de los 3 metabolitos, "B", "C" y "D" son las curvas representadas en "A" por separado para mayor detalles. Eje x: Tiempo en minutos.

3. Modelo murino de farmacocinética poblacional de BNZ

3.2. Recolección de muestras de sangre por punción submandibular

Los volúmenes de sangre obtenidos por ratón y por tiempo en cada punción se encuentran detallados en la Tabla R6.

	Tiempo (horas)	ID ratón	Plasma obtenido (µl)		Tiempo (horas)	ID ratón	Plasma obtenido (µl)
INFECTADO	0.25	1	25	SANO	0.25	19	80
		2	80			21	80
		3	40			22	60
	0.5	4	50		0.5	25	60
		5	10			27	80
		6	50			15	45
	1	7	45		1	17	85
		8	40			18	65
		9	40			14	80
	1.5	11	40		1.5	19	65
		1	100			20	60
		4	200			13	50
	2	7	200		2	23	40
		2	30			16	130
		10	180			21	70
	3	11	30		3	25	70
		3	30			24	65
		9	100			26	65
	4	12	30		4	28	50
		5	20			22	90
		10	10			27	150
	6	11	200		6	15	45
		6	190			17	40
		8	240			24	85
10		260	16	40			
8	12	180	8	19	60		
	2	120		27	150		
	3	150					
	5	150					
		9	15				

Tabla R6. Volúmenes de sangre obtenidos para grupos de ratones “SANOS” o “INFECTADOS”. “ID” es el número identificador de ratón.

## 3.3. Cuantificación de BNZ y pseudo cuantificación de metabolitos

## 3.3.1. Plasma

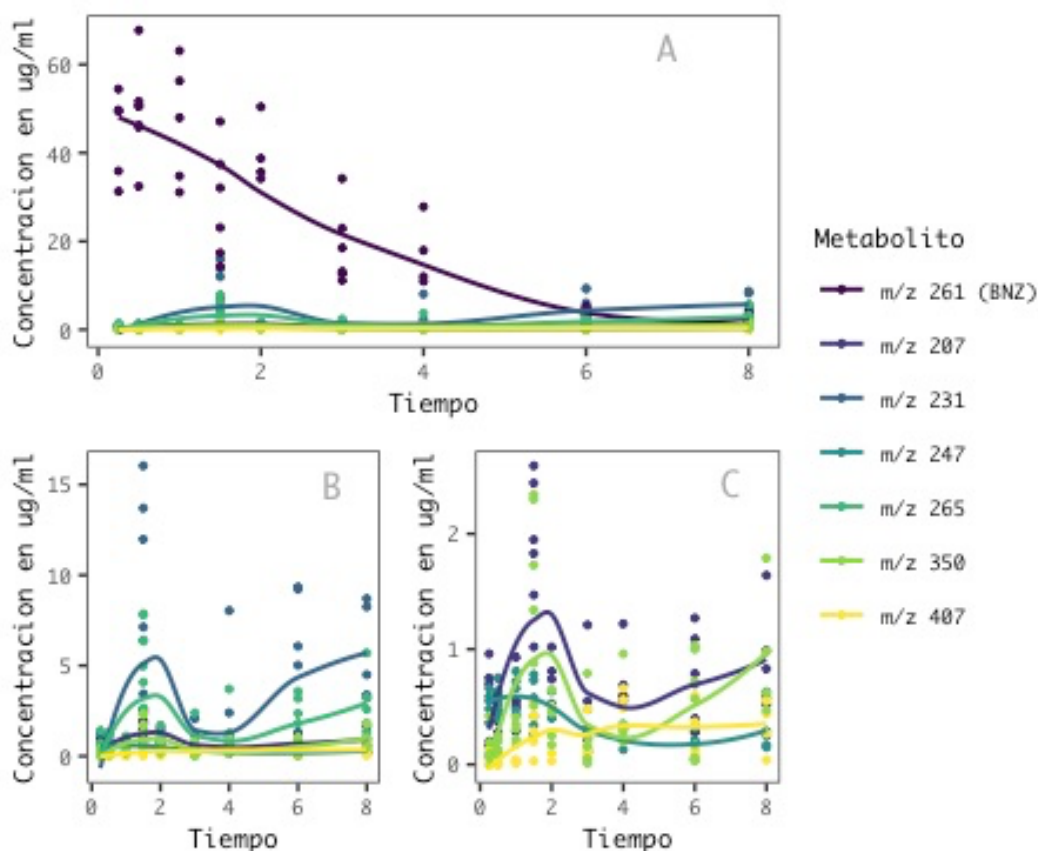
Los valores de concentración de BNZ obtenidos se hallan en Tabla R7.

	Tiempo (horas)	ID ratón	[BNZ] ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		Tiempo (horas)	ID ratón	[BNZ] ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
<b>INFECTADO</b>	0.25	1	49.70	<b>SANO</b>	0.25	19	49.43
		2	35.90			21	54.43
		3	31.30		0.5	15	46.27
	0.5	4	51.65			17	67.73
		5	32.45			18	50.73
		6	45.80		27	50.53	
	1	7	34.75		1	14	63.10
		8	56.30		1.5	13	37.45
		9	31.10			20	47.10
		11	47.95			23	17.33
	1.5	1	23.10		2	16	50.40
		4	32.10			25	35.65
		7	14.40		3	24	12.65
	2	10	38.75			26	11.15
		11	34.20			28	13.15
	3	3	34.20		4	22	28.35
		9	18.50			27	27.80
		12	22.95		6	15	1.38
	4	5	17.95			17	3.52
		10	12.00			24	0.58
11		10.95	8	19	5.51		
6	6	5.17					
	8	5.19					
	10	3.05					
	12	2.17					
8	2	2.02					
	3	3.88					
	5	1.53					
	9	0.72					

**Tabla R7.** Concentración de BNZ medida por tiempo y por animal para grupo de ratones “SANOS” o “INFECTADOS”. “ID” es el número identificador de ratón.

Para la cuantificación de BNZ se empleó el mismo método por HPLC-MS/MS (MRM) que se desarrolló para las muestras de orina (Sección 2.1.2.).

Los metabolitos previamente identificados, fueron detectados en las muestras de plasma de ratones y pseudo cuantificados, es decir, se relativizaron las intensidades de cada uno a la droga madre (BNZ) empleando su curva de calibración. En la Figura R13, se pueden observar las curvas de pseudo concentración en función del tiempo.



**Figura R13.** Gráficos de concentración en función del tiempo en plasma. “A” es la concentración de BNZ y pseudo concentraciones de metabolitos en función del tiempo. “B” representa las curvas de metabolitos (magnificación de “A” sin BNZ) y “C” es las curvas de metabolitos de menores pseudo concentraciones (magnificación de “B” sin m/z 231.1 ni 265.1). Eje x: Tiempo en horas, para “B” y “C” eje y: pseudo concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ).

En general, los metabolitos alcanzaron un máximo de pseudo concentración entre 1.5 y 2 horas post dosis. A partir de ese punto comenzaron a describir un decrecimiento que se extiende hasta las 4 horas post dosis. Luego de ese período, las pseudo concentraciones de la mayoría de los metabolitos comenzaron a aumentar nuevamente, siendo este fenómeno más intenso para  $m/z$  231.1 y  $m/z$  265.1. Además, estos dos metabolitos presentaron las mayores pseudo concentraciones a lo largo del tiempo.

### 3.3.2. Órganos

La cuantificación de BNZ en tejidos se logró satisfactoriamente, hallándose droga en todos los órganos analizados y en todos los horarios, con un amplio rango de concentraciones.

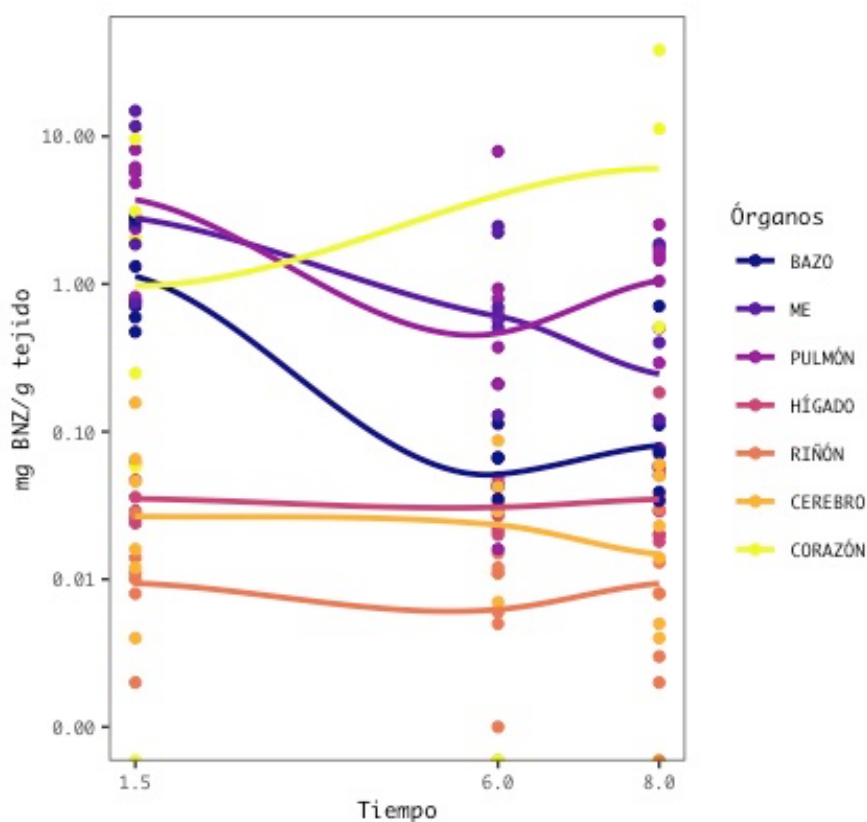
Las concentraciones de BNZ describieron en algunos órganos un doble pico: el primero, en el primer horario (1.5 horas) y el segundo, de menor concentración, en el tercer horario (8 horas). Este comportamiento se observó en pulmón, bazo y, levemente, en hígado, siendo más intenso en los dos primeros. Riñón fue el órgano que presentó las menores concentraciones tisulares de droga ( $< 0.01$  mg BNZ/g tejido) mientras que corazón fue el que presentó las mayores (38.4 mg BNZ/g tejido). Las concentraciones medias de BNZ para cada órgano y tiempo se hallan en la Tabla R8 y las curvas de concentración de BNZ, en escala logarítmica, se hallan en la Figura R14.

El análisis de órganos, demostró que el BNZ es detectado en todos los órganos estudiados, hallándose las concentraciones mayores en pulmón, bazo, músculo esquelético y corazón. También se observó una tendencia, para algunos órganos, de decrecimiento en la concentración del BNZ entre 1.5 y 6 horas, y de crecimiento entre las 6 y 8 horas.



Órgano	Tiempo (horas)		
	1.5	6	8
BAZO	1.45	0.06	0.14
CEREBRO	0.05	0.03	0.02
CORAZÓN	2.51	0.00	8.27
HÍGADO	0.04	0.03	0.05
ME	5.41	0.97	0.62
PULMÓN	4.67	1.55	1.29
RIÑÓN	0.01	0.01	0.01

**Tabla R8.** Concentraciones medias de BNZ en mg BNZ/g tejido. ME es Músculo Esquelético.

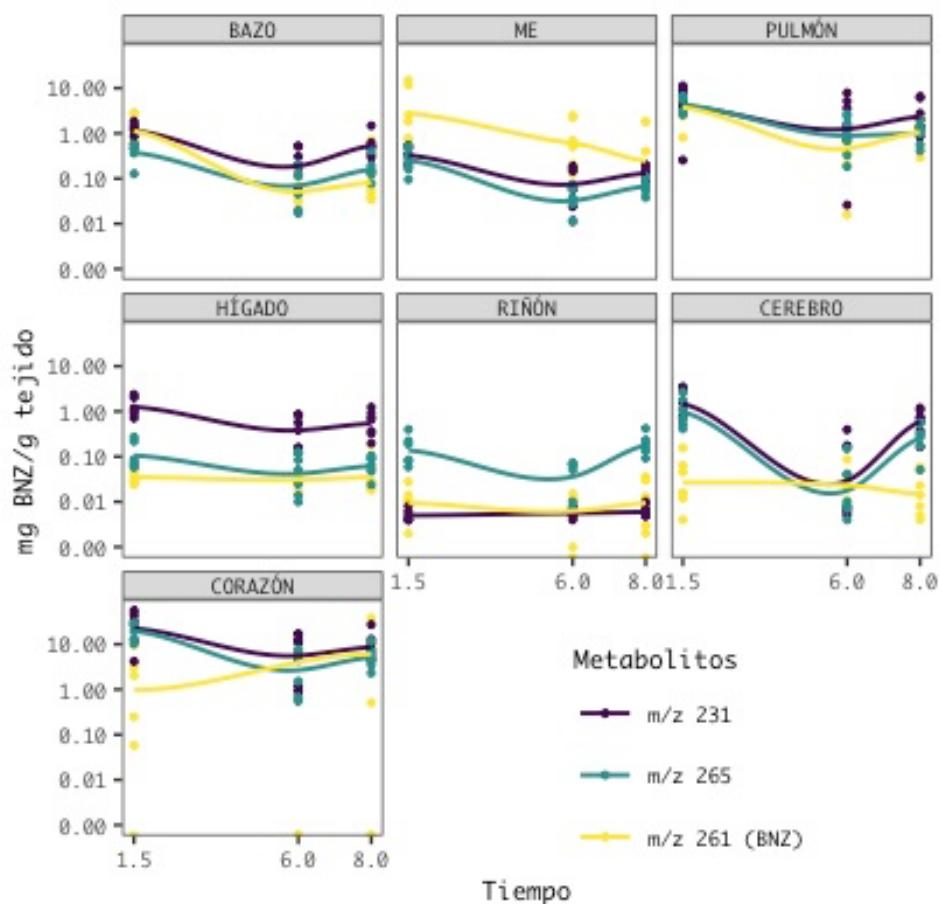


**Figura R14.** Concentración BNZ (en escala logarítmica) en órganos en función del tiempo. Eje x: Tiempo en horas. ME es “Músculo esquelético”.

Por otro lado, la pseudo cuantificación de los metabolitos permitió detectar  $m/z$  231.1 y  $m/z$  265.1 en todos los órganos, mientras que el

resto de los productos metabólicos fueron detectados en algunos de los horarios medidos y no en todos los órganos. Los valores obtenidos se hallaron en un rango de 0.01 y 30.01 mg BNZ/g tejido (ver Tabla R9), hallando las mayores pseudo concentraciones de ambos metabolitos en corazón y pulmón y las menores en riñón.

En la Figura R15 se hallan graficados los valores en escala logarítmica de pseudo concentración de los metabolitos y concentración de BNZ en tejido en función del tiempo.



**Figura R15.** Concentración de BNZ y psuedo concentración de metabolitos (en escala logarítmica) en órganos en función del tiempo. Eje x: Tiempo en horas. ME es “Músculo esquelético”.

		Tiempo (horas)					
		1.5	6	8	1.5	6	8
		m/z 231.1			m/z 265.1		
Órganos	BAZO	1.23	0.26	0.61	0.41	0.10	0.18
	CEREBRO	1.79	0.11	0.70	1.20	0.04	0.32
	CORAZÓN	30.01	8.96	10.49	21.11	4.15	5.80
	HÍGADO	1.38	0.47	0.29	0.13	0.06	0.07
	ME	1.18	0.10	0.14	0.91	0.04	0.07
	PULMÓN	6.30	2.85	3.02	4.61	1.28	1.10
	RIÑÓN	0.01	0.01	0.01	0.17	0.05	0.20

**Tabla R9.** Pseudo-concentraciones medias de metabolitos m/z 231.1 y m/z 265.1 en mg BNZ/g tejido. ME es “Músculo esquelético”.

### 3.4. Modelo de farmacocinética poblacional de un compartimento

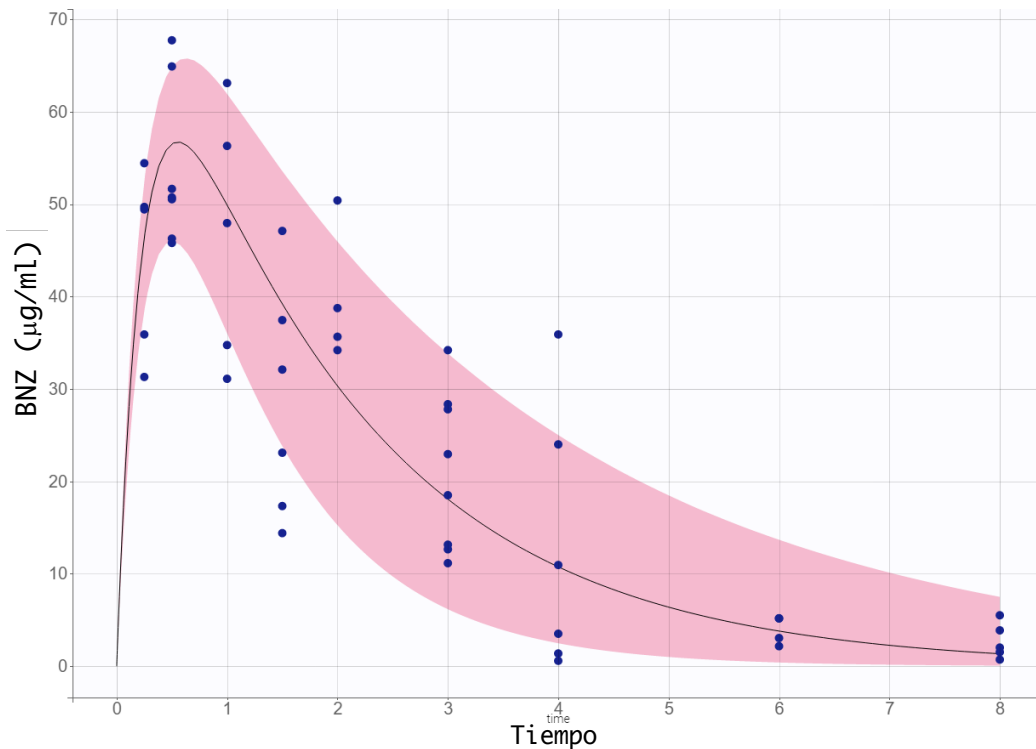
El modelo farmacocinético poblacional seleccionado, modelo unicompartmental con absorción y eliminación lineal, ajustó correctamente con los datos experimentales. La comparación con modelos más complejos, por ejemplo, modelo bicompartmental, no mejoró el ajuste de los datos (delta BIC no significativa,  $p < 0.05$ ).

El pico plasmático de concentración fue de 67.7  $\mu\text{g/ml}$  y se observó a la media hora post administración oral de BNZ (Figura R16).

Los parámetros farmacocinéticos poblacionales obtenidos por el modelo se hallan descritos en la Tabla R10. La absorción fue rápida con un valor  $K_a = 2.93 \text{ hora}^{-1}$ , el volumen de distribución (V) fue de 24.9 ml, la vida media de 1.1 hora para los no infectados y 1.6 hora para los infectados y el clearance (Cl) de 16.3 ml/hora, asumiendo que el peso estimado por ratón es de 20 gramos.

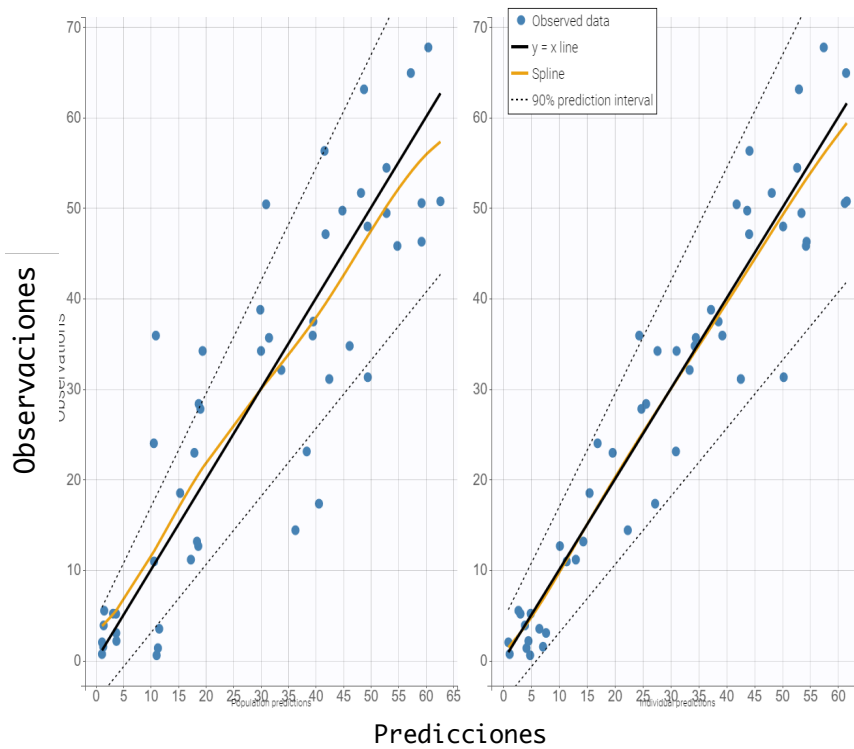
La infección tuvo impacto estadísticamente significativo a nivel del V, obteniendo para el grupo infectado un valor igual a 37.6 ml (24.9

ml del valor estimado promedio en no infectados + 12.7 ml diferenciales en animales infectados,  $p < 0.0001$ ). Respecto a los otros parámetros farmacocinéticos, la infección no implicó impacto alguno, obteniendo valores similares para ambos grupos.



**Figura R16.** Curva estimada de concentración de BNZ en función del tiempo. Eje x: Tiempo en horas.

En la Figura R17 se hallan los gráficos de observaciones vs predicciones individuales y poblacionales.



**Figura R17.** Gráficos de valores observados en función de predichos, de izquierda a derecha a nivel poblacional e individual.

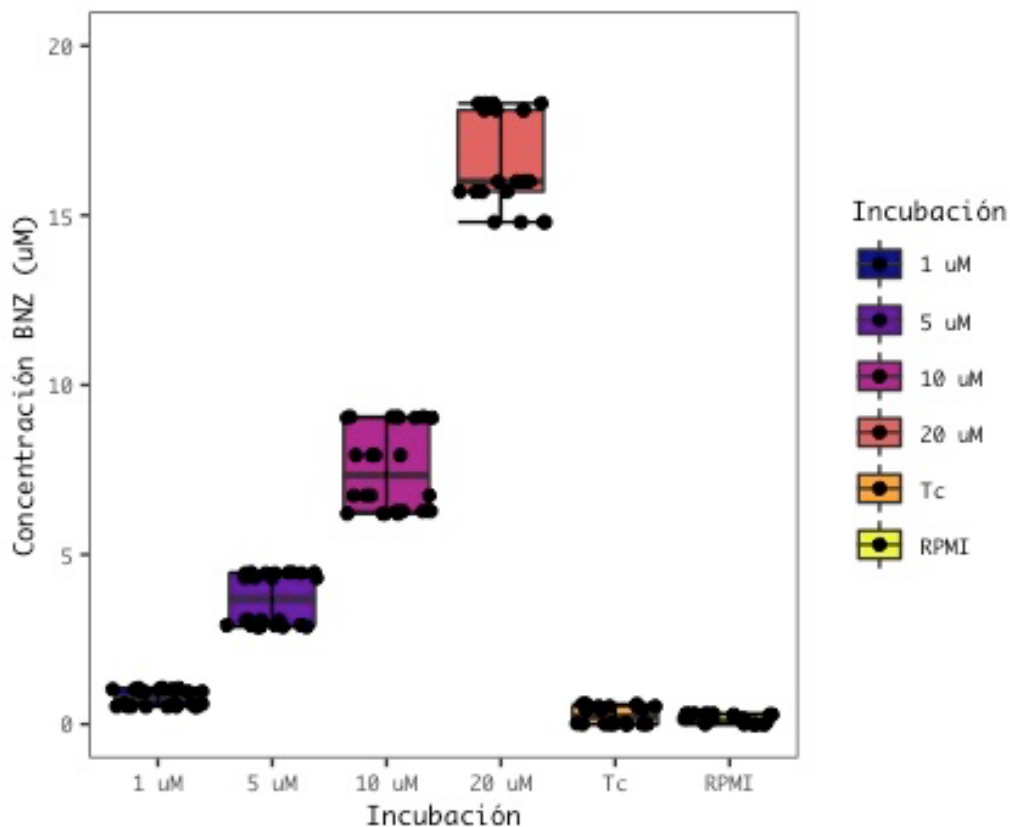
		Valores	EE	ERS (%)
Efectos Fijos	Ka (h <sup>-1</sup> )	2.93	0.349	11.9
	V (L)	0.0249	0.001	3.07
	Cl (L/h)	0.0163	0.0014	8.64
	Beta_V_inf (L)	0.0127	0.0276	21.7
SD de Efectos Aleatorios	omega_ka	0.558	0.065	117
	omega_V	0.0086	0.0124	145
	omega_Cl	0.341	0.084	24.6
Error de Parámetros	a	2.51	1.14	45.4
	b	0.155	0.0619	39.9

**Tabla R10.** Parámetros farmacocinéticos poblacionales. “SD” es Desviación Estándar, “EE” Error Estándar y “ERS” Error Residual, “Ka” constante de absorción, “V” volumen de distribución control, “Cl” clearance, “Beta\_V\_inf” volumen de distribución infectados  $p < 0.0001$ .

#### 4. Perfil de metabolitos de BNZ producido por *Trypanosoma cruzi*

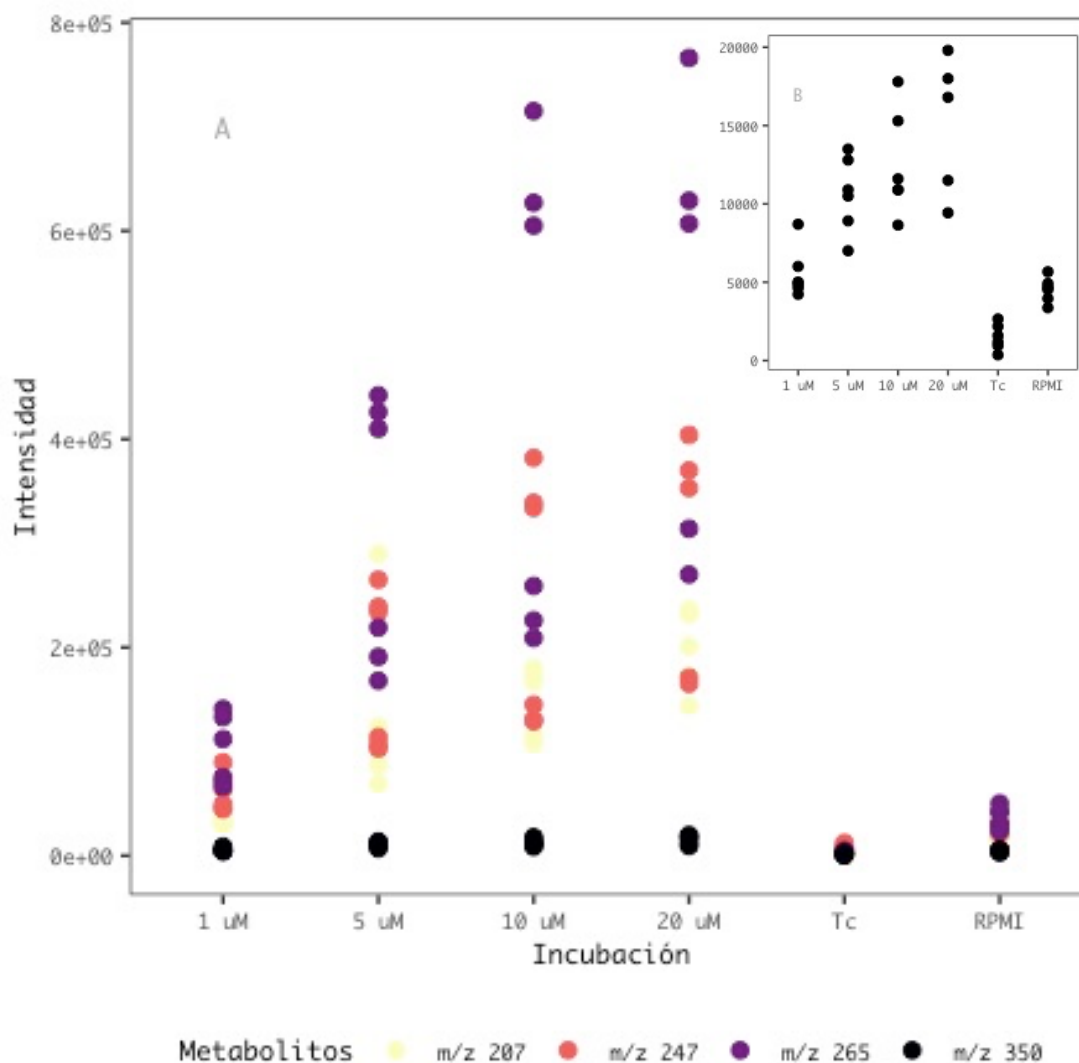
##### 4.1. Cuantificación de BNZ y búsquedas dirigidas de sus metabolitos

Para la cuantificación de BNZ se empleó el método descrito previamente (Sección 2.1.2.) y las búsquedas dirigidas se basaron en los hallazgos de los metabolitos identificados en orinas. Los resultados promedio de la cuantificación para cada una de las 4 incubaciones (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) fueron: 0.78, 3.68, 7.54 y 16.58  $\mu\text{M}$  respectivamente (ver Figura R18). Estos resultados demostraron que los parásitos metabolizaron entre un 22 y un 17.1 % del BNZ con el que fueron incubados.



**Figura R18:** Concentración de BNZ en parásitos cuantificada post 24 horas en función de las diferentes incubaciones; las mismas son BNZ (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ), Tc (parásitos sin BNZ) y RPMI solo.

Tras realizar las búsquedas dirigidas de metabolitos, se detectaron:  $m/z$  207.1,  $m/z$  247.1,  $m/z$  265.1 y  $m/z$  350.1. No se hallaron  $m/z$  231.1 ni los conjugados con ácido glucurónico. En la Figura R19 se observan las intensidades obtenidas de cada metabolito para cada incubación, observándose las mayores intensidades para  $m/z$  265.1 y las menores para  $m/z$  350.1.



**Figura R19.** Intensidad de metabolitos de BNZ en parásitos en función de las concentraciones de incubación a 24 horas, las mismas son BNZ (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M), Tc (parásitos sin BNZ) y RPMI solo. En “A” se hallan graficados los metabolitos  $m/z$  207.1,  $m/z$  247.1,  $m/z$  265.1 y  $m/z$  350.1, en “B” se puede observar a  $m/z$  350.

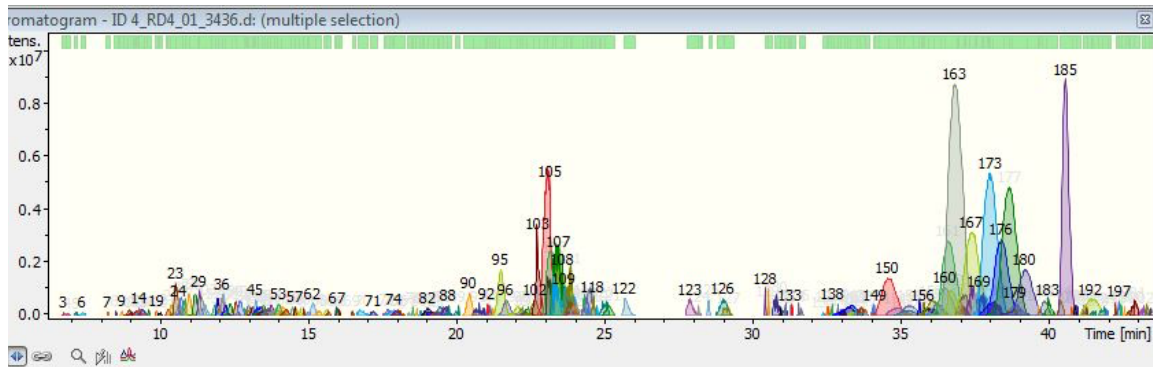
## 5. Estudio retrospectivo y exploratorio de biomarcadores predictores de reacciones adversas (RA)

### 5.1. Top-down

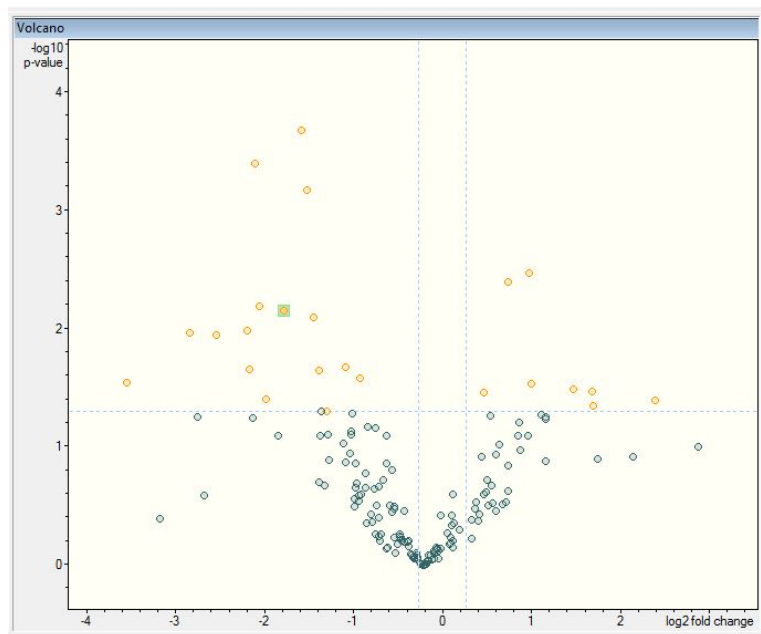
Con el análisis de las muestras por MS, se obtuvieron los correspondientes cromatogramas (ejemplo en Figura R20) con los perfiles de proteoformas cuya información permitió llevar a cabo del análisis por MS/MS. La creación de estos perfiles es realizada automáticamente por el software BioTools, que posteriormente emplea los datos de intensidades de proteoformas para realizar comparaciones entre grupos (test t Student). Como resultado se obtuvieron gráficos volcán (ejemplo en Figura R21) en donde cada punto es una proteoforma analizada, aquellos con color anaranjado corresponden a los que presentan diferencias significativas, mientras más hacia los extremos y hacia arriba, mayor significancia. Los puntos verdes son proteoformas que no presentaron diferencias significativas.

Las proteoformas candidatas (diferencias significativas), fueron seleccionadas para crear la lista de precursores a analizar por MS/MS y obtener los patrones de fragmentación. Para que una proteoforma fuese sometida a MS/MS debió cumplir dos condiciones: presentar diferencia significativa en alguna comparación pero también describir alta intensidad. Por este motivo muchas proteoformas que presentaron diferencias significativas, no fueron seleccionadas para el análisis por MS/MS por presentar baja intensidad. A pesar de esto, algunas las proteoformas seleccionados no fueron detectados en el análisis por MS/MS.





**Figura R20.** Cromatograma obtenido de una muestra de BNZ sin reacción adversa (sin RA). Los diferentes colores representan proteoformas definidas por el algoritmo del software Biotoools y los números sobre cada pico es la cantidad de proteínas que la conforman. Eje x: Tiempo (min), eje y: Intensidad.



**Figura R21.** Gráfico volcán obtenido de la comparación de muestras del grupo de paciente sin RA durante el tratamiento con NFX vs con A durante el tratamiento con NFX. Eje x: Fold Change (cambio en la proporción), eje y:  $-\log p$ .

Una vez obtenidos los patrones de fragmentación, se inició el proceso de comparación con las bases de datos a fin de hallar la identidad de proteínas. En algunos casos no se logró identificar la proteína (no hits), pero en los casos en los que hubo identificación (hit) estos resultados fueron obtenidos asociados a un puntaje de confiabilidad. En las Tablas R11 (para BNZ) y R12 (para NFX) se hallan los resultados obtenidos, en donde se describen los iones precursores empleados para el análisis por MS/MS con su correspondiente carga, masa monoisotópica, p valor obtenido en la comparación y la identidad de la proteína. Los resultados pueden ser: “No hits”, es decir, no se logró hallar la identidad de la proteína, “Hit” con la identificación de la proteína asociado a un determinado grado de confiabilidad (puntaje o score obtenido al realizar el análisis) o la no detección del ion durante el análisis por MS/MS, debido a su baja intensidad.

Regulado en	Ion Precursor	Carga	MM	p valor	Identidad Proteina
con RA	917.8697	15+	13753.9317	0.0096	Transtiretina
	1529.108	9+			
	928.8000	15+	13872.8974	0.0140	Transtiretina
	991.8562	14+			

**Tabla R11. Parte I.** Resultados obtenidos para comparación **sin RA** vs **con RA** BNZ. “**sin RA**” es el grupo muestras de pacientes durante tratamiento sin RA, “**con RA**” es el grupo de muestras de pacientes durante tratamiento con RA. “MM” es Masa Monoisotópica. Solamente se identificaron proteínas en el grupo **con RA**.

Regulado en	Ion Precursor	Carga	MM	P valor	Identidad Proteina
con RA	817.0179	17+	13873.1825	0.0058	Transtiretina

Tabla R11. Parte II. Resultados obtenidos para comparación **pre-trat** vs **con RA** BNZ. “**pre-trat**” es el grupo de muestras de pacientes que sufrieron RA durante el tratamiento con BNZ. Solamente se identificó una proteína en el grupo **con RA**.

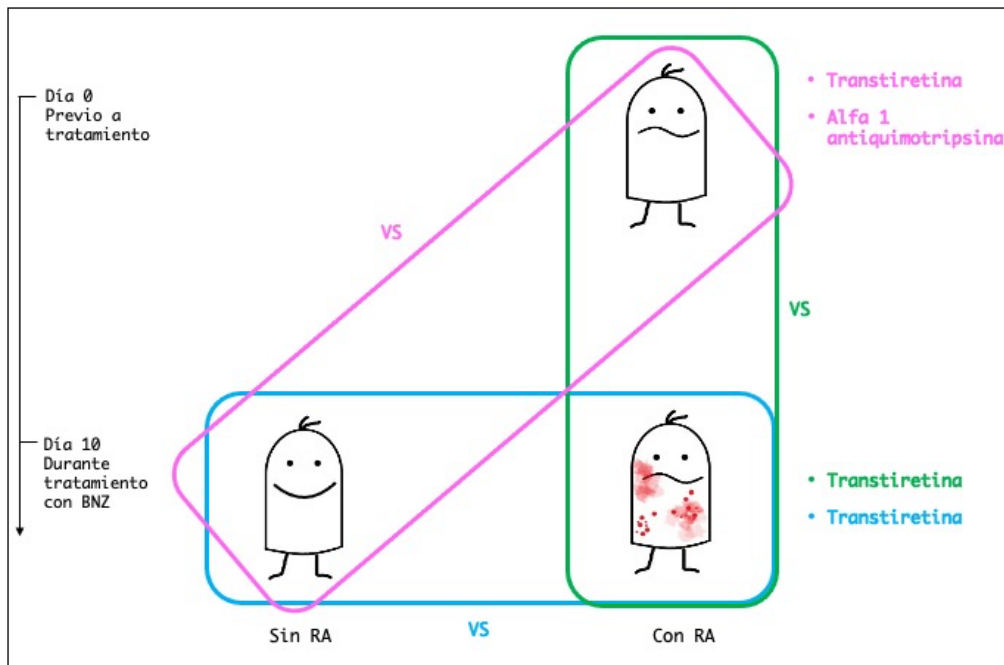
Regulado en	Ion Precursor	Carga	MM	p valor	Identidad Proteina
pre-trat	862.5167	16+	13785.1584	0.0253	Transtiretina
	919.9502	15+			
	1532.5783	9+			
	726.229	6+	4352.3388	0.0042	Alfa 1 antitripsina
	871.2735	5+			
	1088.8394	4+			
	862.5014	16+	13784.8996	0.0253	Transtiretina
	985.571	14+			
	1532.5484	9+			
	1379.3957	10+			
	630.5902	4+	2519.3385	0.0368	Alfa 1 antitripsina
	840.4502	3+			

Tabla R11. Parte III. Resultados obtenidos para comparación **pre-trat** vs **sin RA** BNZ. Solamente se identificaron proteínas en el grupo **pre-trat**.

Para BNZ, se identificaron 2 proteínas con alto grado de confiabilidad: transtiretina y alfa 1 antitripsina. A fin de clarificar los resultados, en la Figura R22 se halla un esquema con las proteínas identificadas, y que grupo se hallan reguladas tras realizar la comparación.

La transtiretina aparece regulada en el grupo con RA en dos comparaciones diferentes: al comparar contra el grupo sin RA y contra el grupo pre-tratamiento. A su vez, aparece regulada con la Alfa 1

quimiotripsina en el grupo pre-tratamiento pero cuando se lo compara contra sin RA.



**Figura R22.** Esquema de proteínas obtenidas para BNZ. Los rectángulos representan las comparaciones entre grupos, cada una con un color específico. Las proteínas identificadas, se hallan posicionadas al lado del grupo en donde se encuentran reguladas y con el color correspondiente a la comparación de donde surgieron. Celeste: sin RA vs con RA, verde: pre-tratamiento vs con RA y en rosa: sin RA vs pre-tratamiento.

Para NFX, se identificaron 5 proteínas con alto grado de confiabilidad: alfa 1 antiqumotripsina, serina/treonina proteína quinasa, apolipoproteína A1, hemoglobina y cadena alfa de fibrinógeno. La Figura R23 presenta un esquema de estos resultados.

Regulado en	Ion Pre-cursor	Carga	MM	p va-lor	Identidad Proteina
sin RA	808.8491	2+	1616.6910	0.0069	Serina/Treonina proteina qui-nasa
	827.9641	15+	14059.2672	0.0289	Serina/Treonina proteina qui-nasa
	879.6484	16+			
	1563.0362	9+			
con RA	525.5406	4+	2099.1384	0.0002	Apolipoproteina A1
	700.3839	3+			
	1050.071	2+			
	655.7679	3+	3274.8088	0.0107	Hemoglobina

Tabla R12. Parte I. Resultados obtenidos para comparación sin RA vs con RA NFX. Se identificaron proteínas en ambos grupos.

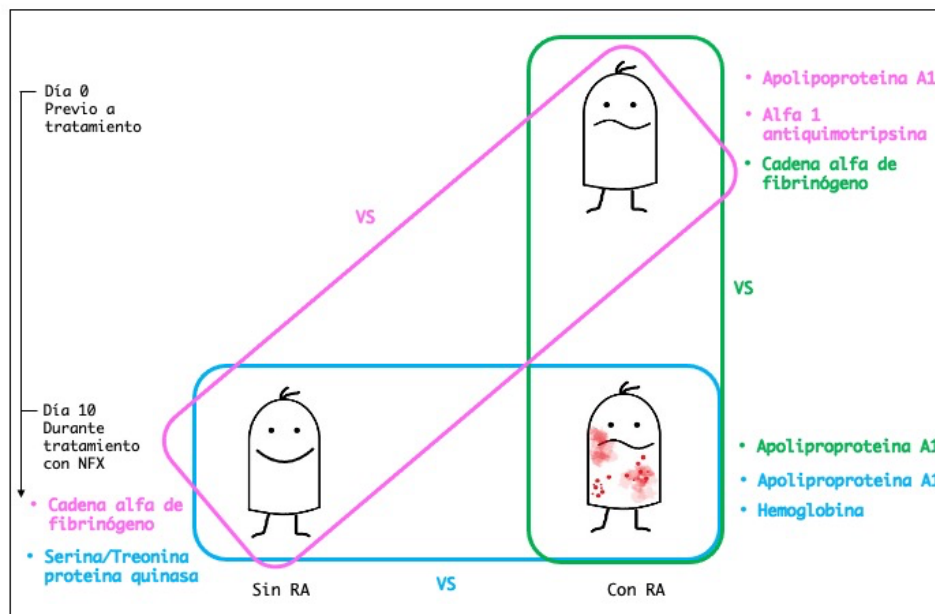
Regulado en	Ion Pre-cursor	Carga	MM	p va-lor	Identidad Proteina
pre-trat	515.8889	3+	1545.6516	0.0360	Cadena alfa de fibrinógeno
	773.3294	2+			
con RA	52.5512	4+	2099.1816	0.0203	Apolipoproteina A1
	700.3984	3+			
	1050.0938	2+			

Tabla R12. Parte II. Resultados obtenidos para comparación pre-trat vs con RA NFX. Se identificaron proteínas en ambos grupos.

Regulado en	Ion Pre-cursor	Carga	MM	P va-lor	Identidad Proteina
sin RA	808.8491	2+	1616.8491	0.0453	Cadena alfa de fibrinógeno
	594.8278	4+	2376.2892	0.0454	Alfa 1 antitripsina
pre-trat	498.6808	5+	2489.3728	0.0469	Alfa 1 antitripsina
	923.0987	4+			
	830.462	3+			
	525.5505	4+	2099.1798	0.0103	Apolipoproteina A1
	700.398	3+			
	623.0997	4+	2489.3767	0.0469	Alfa 1 antitripsina
	830.4632	3+			
	1245.191	2+			
	525.5515	4+	2099.1823	0.0103	Apolipoproteina A1
	700.3986	3+			
	1050.094	2+			

Tabla R12. Parte III. Resultados obtenidos para sin RA vs pre-trat NFX. Se identificaron proteínas en ambos grupos.

Con el mismo comportamiento que la transtiretina, en este caso se halló la proteína Apolipoproteína A1 regulada en el grupo con RA frente a los grupos sin RA y pre-tratamiento, apareciendo también regulada en el grupo pre-tratamiento al comparar con el grupo de muestras sin RA. De manera similar que en BNZ, la alfa 1 antiqumotripsina se halló regulada en el pre-tratamiento al comparar con las muestras sin RA.



**Figura R23.** Esquema de proteínas obtenidas para NFX. Los rectángulos representan las comparaciones entre grupos, cada una con un color específico. Las proteínas identificadas, se hallan posicionadas al lado del grupo en donde se encuentran reguladas y con el color correspondiente a la comparación de donde surgieron. Celeste: sin RA vs con RA, verde: pre-tratamiento vs con RA y en rosa: sin RA vs pre-tratamiento.

## 5.2. Bottom-up

Las proteínas identificadas en esta etapa fueron 163, pero debido a la necesidad de fijar un umbral mínimo y arbitrario de intensidad, se emplearon 117 para las comparaciones entre grupos, las siguiente proteínas descritas en la Tabla R14:

1	Componente P amiloide sérico
2	Proteína S dependiente de vitamina K
3	Proteína básica plaquetaria
4	N-Acetil Muramoil-L-Alanina Amidasa
5	Proteína AMBP
6	Complemento o componente C7
7	Cadena alfa fibrinógeno
8	Proteína zona de embarazo
9	Subunidad beta de hemoglobina
10	Subunidad alfa de hemoglobina
11	Apolipoproteína E
12	Apolipoproteína C-III
13	Apolipoproteína C-I;Apolipoproteína truncada C-I
14	Proteína relacionada a haptoglobina
15	Proteína amiloide A sérico
16	Apolipoproteína A-IV
17	Ig cadena pesada región variable
18	Cadena pesada región variable
19	Ig cadena pesada variable 5-51
20	Cadena FS-1 crioaglutinina
21	Cadena liviana variable región MS-D1
22	Ig reactiva a miosina cadena pesada variable
23	Ig cadena pesada constante alfa 2
24	Ig cadena pesada constante gamma 2
25	Cadena liviana variable región GCT-A5
26	Ig cadena pesada constante gamma 3
27	L1TD1
28	Calicreína plasmática
29	Complemento subcomponente C1s
30	Complemento componente C8 cadena beta
31	Clon cDNA neuroblastoma

32	Adiponectina C
33	Globulina fijadora de tiroxina
34	IGL@ proteína
35	Ig cadena liviana variable kappa 1-12
36	Ig cadena liviana variable lambda 3-25
37	Proteína sin caracterizar
38	Antígeno tipo CD5
39	Ig reactiva a miosina cadena liviana variable
40	Ig cadena pesada constante gamma 1
41	Ig cadena liviana variable kappa
42	Zinc-alfa-2-glicoproteína
43	Apolipoproteína L1-B3
44	Alfa-2-glicoproteína rica en leucina
45	Ig cadena pesada constante gamma 4
46	Alfa 2-antiplasmina
47	Serpina clado D (cofactor heparina )
48	Gelsolina
49	Complemento componente 9
50	Cadena pesada variable región 10E8
51	Proteína de unión C4b cadena alfa
52	Globulina fijadora de corticoesteroides (transcortina)
53	Complemento C5
54	Afamina
55	Similar a cistatina
56	Beta globina
57	Serpina clado C (Antitrombina)
58	Globina C1
59	Protrombina
60	Fibronectina
61	Plasminógeno
62	Complemento factor B
63	Beta-2-glicoproteína 1
64	Inhibidor de la proteinasa de angiotensinógeno (Ser o Cys)
65	Complemento factor H
66	Alfa-2-HS-glicoproteína
67	Apolipoproteína A-II
68	Alta similitud a serotransferrina
69	HEL-213
70	Hemopexina
71	Seroalbúmina
72	Ig cadena pesada constante mu



73	Haptoglobina
74	Alfa-1-antitripsina
75	Transtirretina
76	Complemento C4-A
77	Complemento componente C8
78	Ig cadena liviana lambda región V-III SH
79	Calicreína B
80	Globulina de unión a hormona sexual
81	Apolipoproteína D
82	Complemento C1q subcomponente subunidad C
83	
84	Ig cadena liviana lambda región V-VI AR
85	Proteína 4 de unión a retinol
86	Ig cadena J
87	Complemento C1q subcomponente subunidad B
88	Ig cadena pesada variable 4-30-4
89	Ig cadena liviana lambda región Hil V-IV
90	Ig cadena pesada delta C
91	Complemento C4-B
92	Complemento componente C8 cadena gamma
93	Ig cadena pesada V-III región JON
94	Ig cadena liviana kappa
95	Cadena pesada variable región IBM-A1
96	Vitronectina
97	Inhibidor C1 plasmático de proteasas
98	Paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica
99	Clusterina
100	Kininógeno-1
101	Alfa-1B-glicoproteína
102	Anti-FactorVIII scFv
103	Apolipoproteína B-100
104	Cadena pesada H1 del inhibidor de inter-alfa-tripsina
105	Alfa-1-antiquimotripsina
106	Cadena pesada H2 del inhibidor de inter-alfa-tripsina
107	Proteína ITIH4
108	Alfa-1-glicoproteína ácida 2
109	Similar a proteína SNC73
110	IGK@ proteína
111	Serotransferrina
112	Proteína de unión a vitamina D
113	Alfa-1-glicoproteína ácida

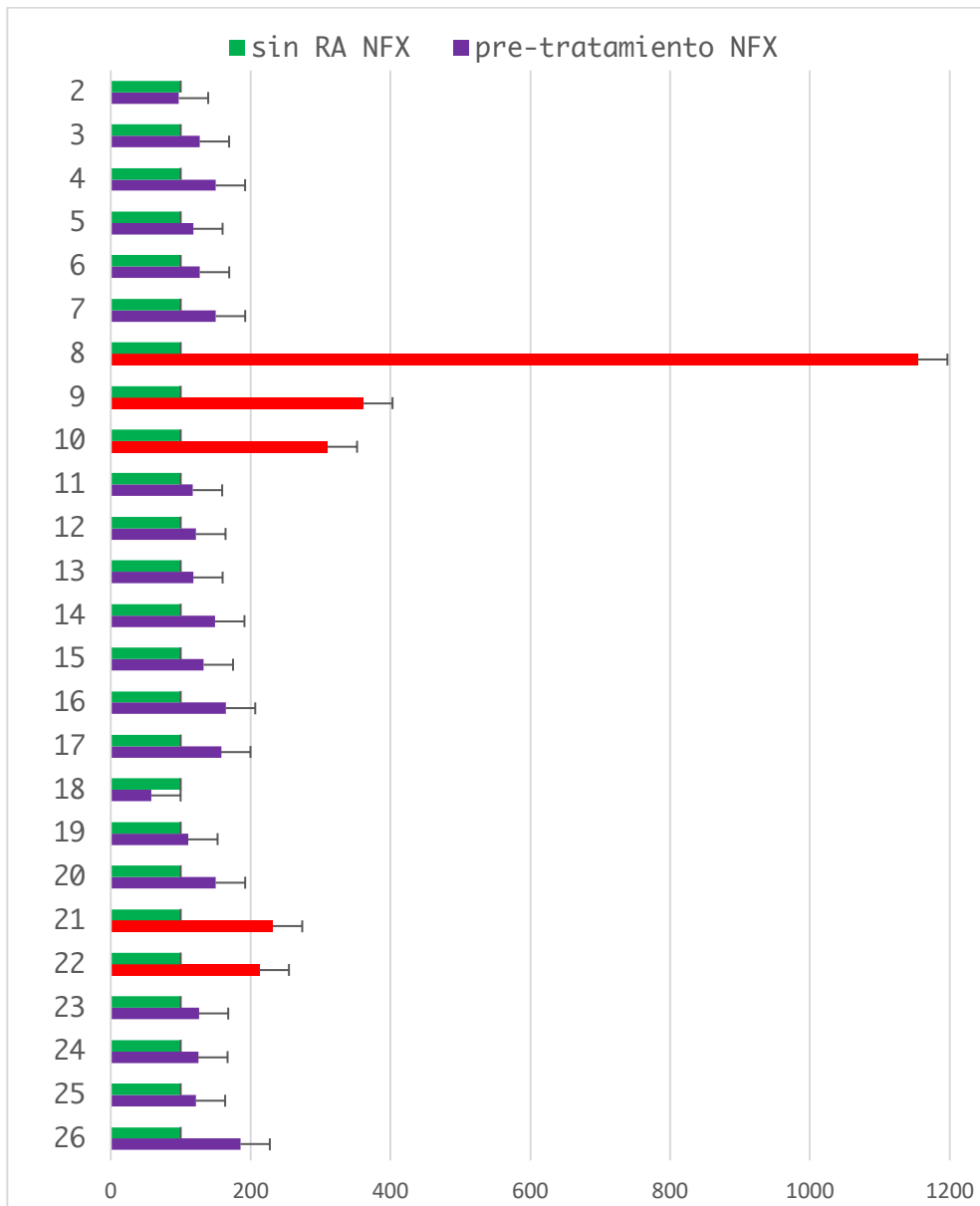
114	Complemento C3
115	Alfa-2-macroglobulina
116	Ceruloplasmina
117	Apolipoproteína A-I

**Tabla R14.** Listado de proteínas identificadas y utilizadas para llevar a cabo el análisis entre grupos.

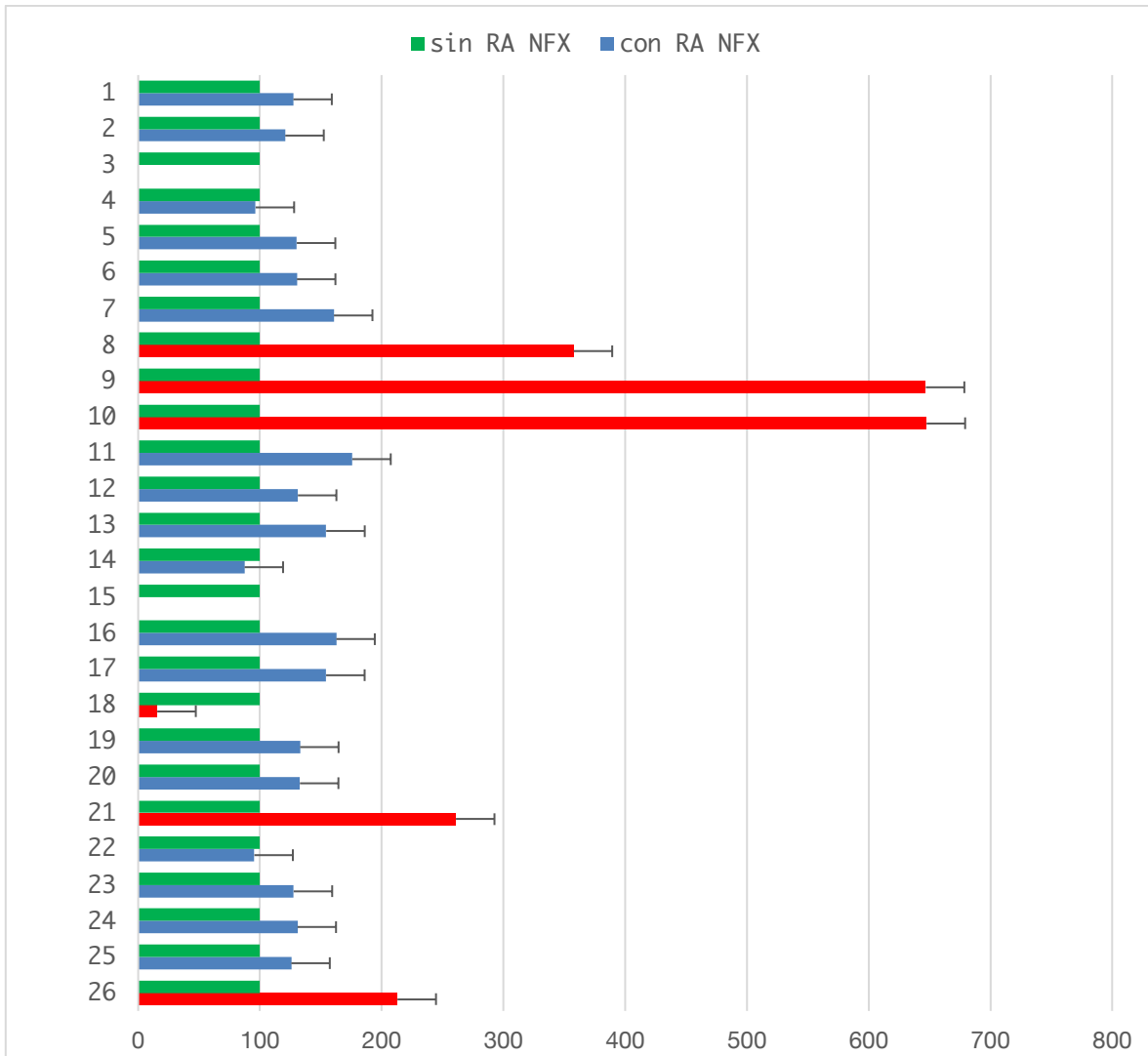
Los resultados obtenidos de las comparaciones entre los diferentes grupos se pueden observar en las Figuras 23 a 28. En estos gráficos de barras, los valores del grupo sin RA constituyen el 100% de la expresión de una proteína particular, esto es debido a que el software Maxq utiliza medidas de relativización para llevar a cabo pseudo cuantificaciones. Por este motivo no se obtuvieron cantidades netas de una determinada proteína sino que se plantea que la expresión de una proteína es significativamente mayor o menor que en el grupo sin RA.

Los resultados para NFX de la comparación de muestras sin RA con muestras obtenidas pre-tratamiento se hallan en la Figura R23, observándose como proteínas más relevantes: proteína de zona de embarazo (8), subunidad beta (9) y alfa (10) de hemoglobina, MS-D1 cadena liviana región variable (21) y cadena pesada región variable de inmunoglobulina reactiva a miosina (22). Todas las proteínas mencionadas se hallan reguladas en el estadio pre-tratamiento.

En la Figura R24, se presentan los resultados de NFX para la comparación de los grupos sin RA vs con RA. En este caso se halló una proteína regulada en sin RA: cadena pesada región variable (18) y varias reguladas en con RA: proteína de zona de embarazo (8), subunidad beta (8) y alfa (10) de hemoglobina, cadena pesada región variable (18), MS-D1 cadena liviana región variable (21), cadena pesada gamma 3 constante de inmunoglobulina (26).

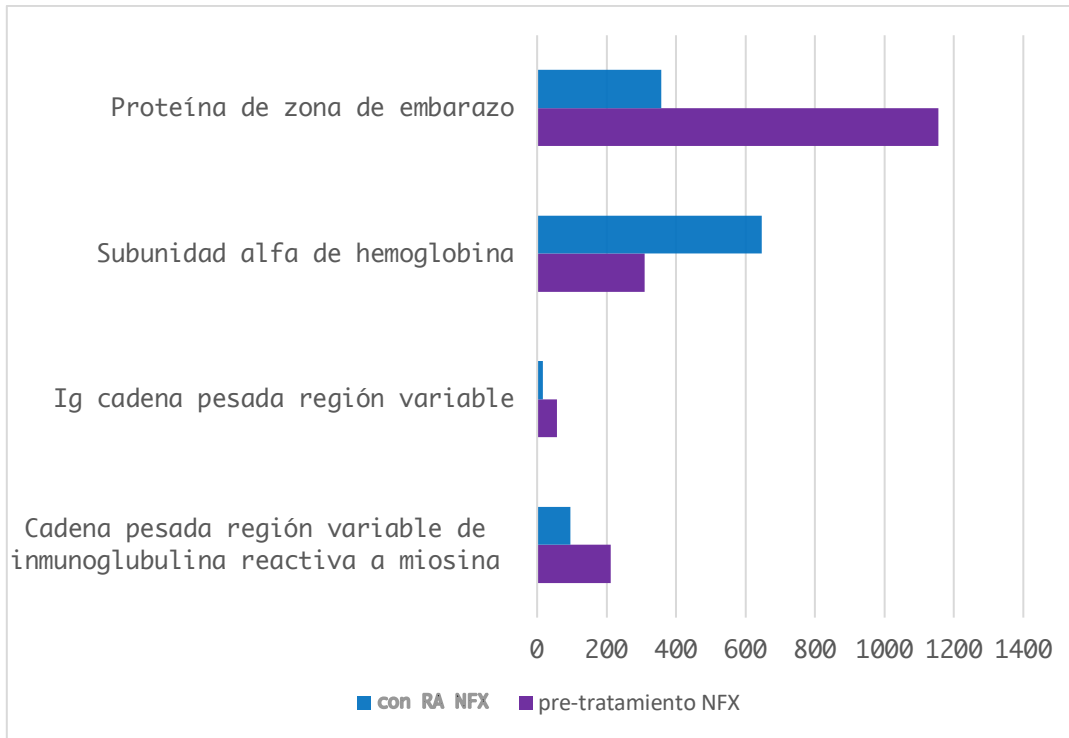


**Figura R23.** Muestras **sin RA** vs muestras **pre-trat** para NFX. En color rojo se hallan resaltadas las proteínas más relevantes. Eje y: proteínas (ver referencias de números en Tabla R14), Eje x: porcentaje.



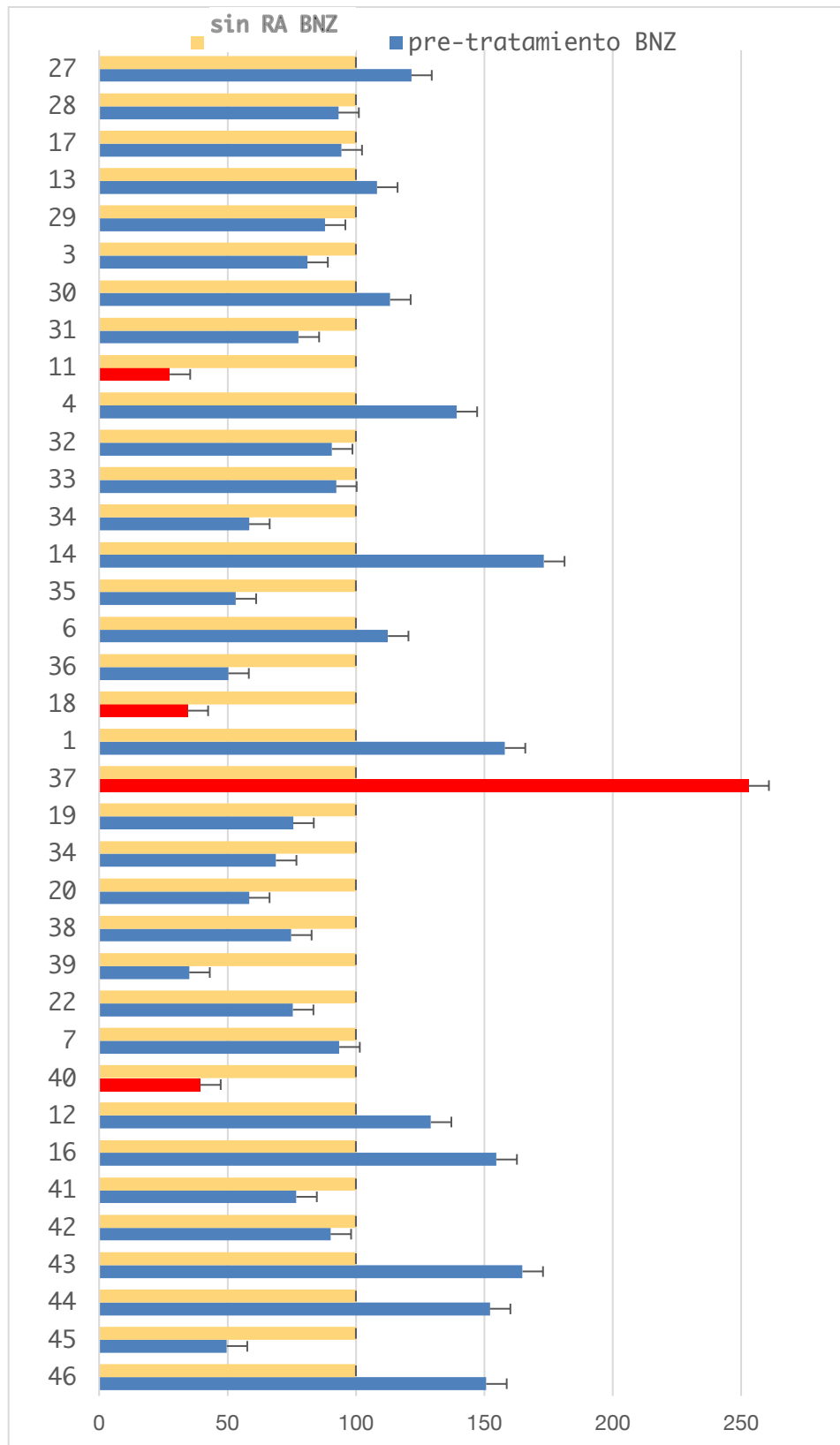
**Figura R24.** Muestras **sin RA** vs muestras **con RA** para NFX. En color rojo se hallan resaltadas las proteínas más relevantes. Eje x: porcentaje.

Por último, la comparación entre muestras del grupo de pacientes pre-tratamiento vs con RA arrojó solamente cuatro proteínas: proteína de zona de embarazo (8), Ig cadena pesada región variable (17) y cadena pesada región variable de inmunoglobulina reactiva a miosina (22) reguladas en el grupo pre-tratamiento y subunidad alfa de hemoglobina (10) regulada en el grupo con RA.



**Figura R25.** Muestras **pre-trat** vs muestras **con RA** para NFX, valores normalizados al grupo sin EA.

Con respecto al BNZ, en la Figura R26 se encuentra la comparación de muestras sin RA con muestras obtenidas pre-tratamiento con esta droga. Para esta droga se encontró solamente una proteína regulada en el grupo pre-tratamiento, que no pudo ser identificada, mientras que se caracterizaron varias proteínas reguladas significativamente en el grupo sin EA: apolipoproteína E (11), cadena pesada región variable (18), Ig cadena pesada constante gamma 3 (26), Ig cadena pesada constante gamma 1 (40), beta globina (56) y globina C1 (58).



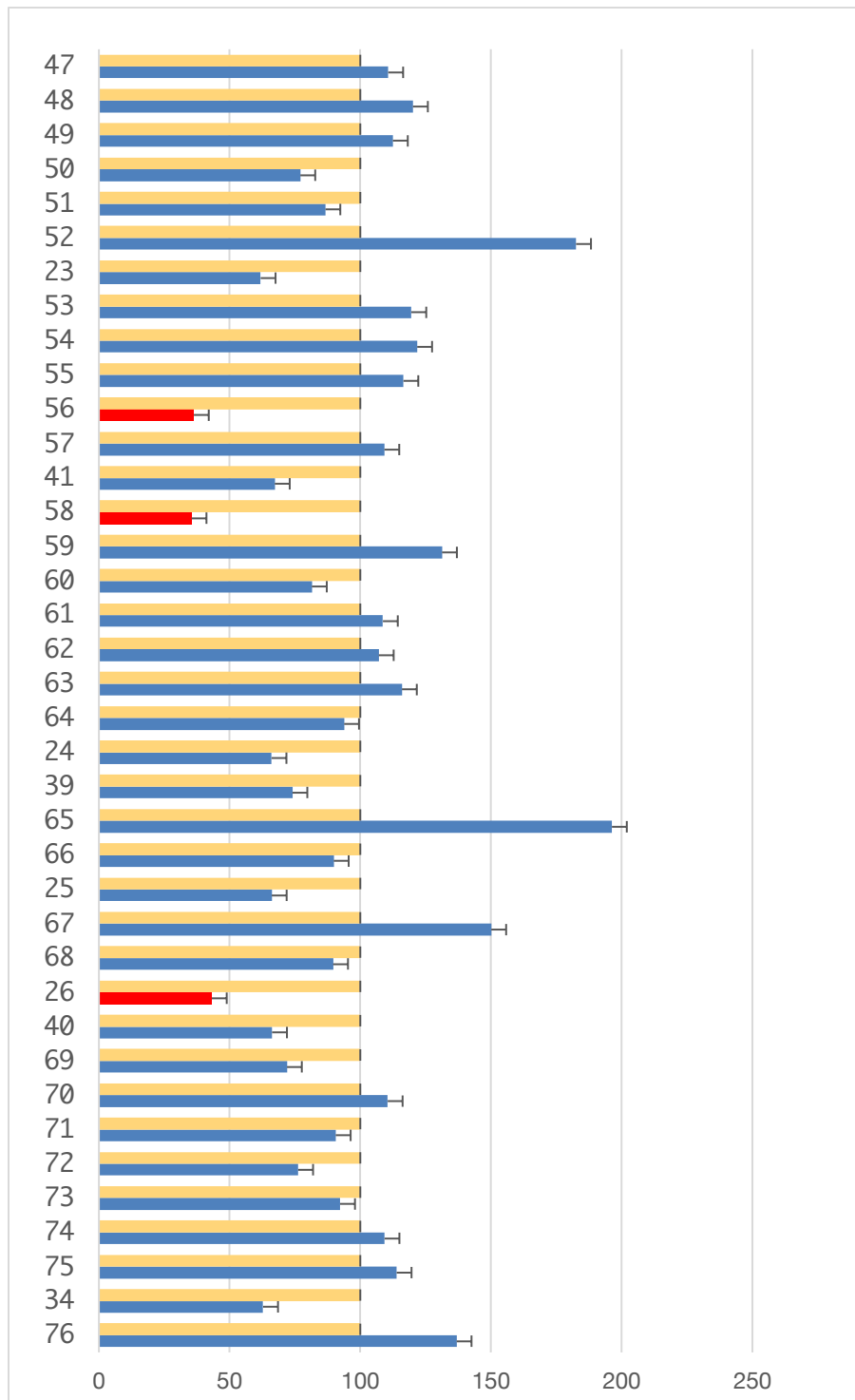
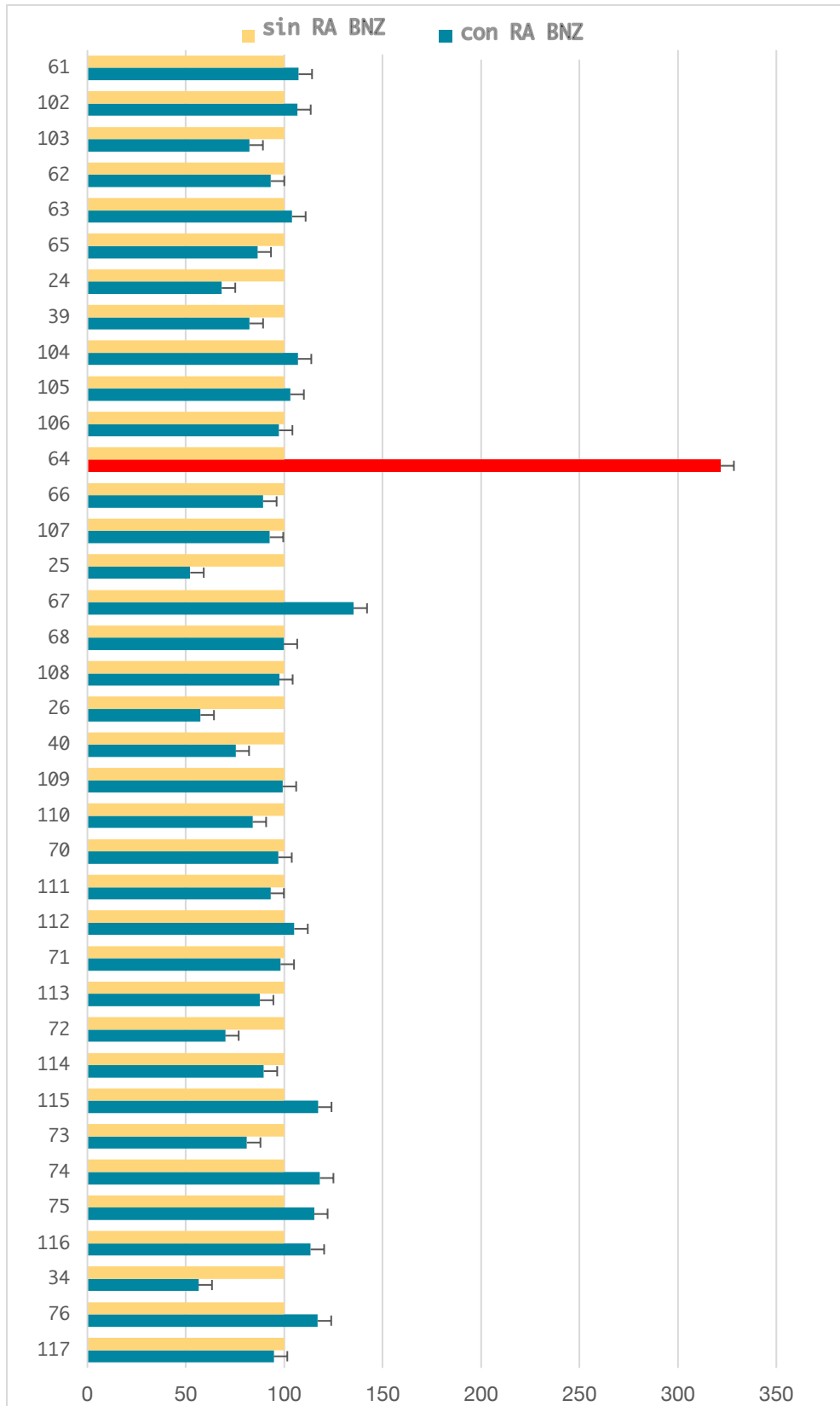


Figura R26. Muestras sin RA vs muestras pre-trat para BNZ. En color rojo se hallan resaltadas las proteínas más relevantes. Eje x: porcentaje.

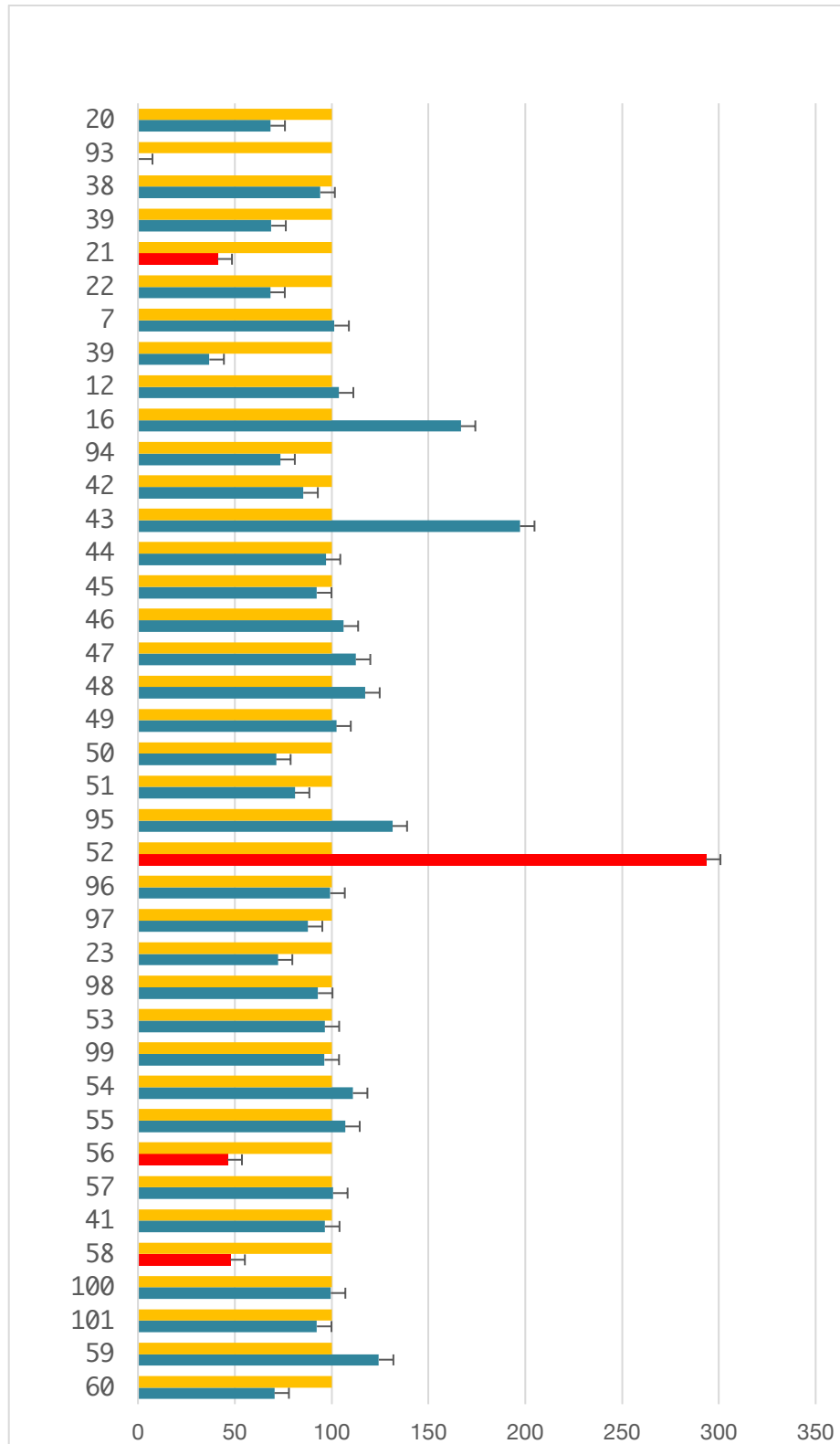
La Figura R27 describe los resultados de la comparación de muestras sin RA con muestras obtenidas durante los eventos adversos ocasionados por BNZ (con RA), en este caso hubo varias proteínas reguladas en cada grupo. Para el grupo sin EA se hallaron: apolipoproteína E (11), cadena pesada región variable (18), cadena liviana variable región MS-D1 (21), Ig cadena liviana variable kappa 1-12 (35), Ig cadena pesada constante gamma 1 (40), beta globina (56), globina C1 (58) y Ig cadena liviana lambda región H1L V-IV (89). Mientras que para el grupo con EA, las proteínas identificadas fueron: proteína relacionada a haptoglobina (14), globulina fijadora de corticoesteroides (transcortina) (52) e inhibidor de la proteínasa de angiotensinógeno (Ser o Cys) (64).

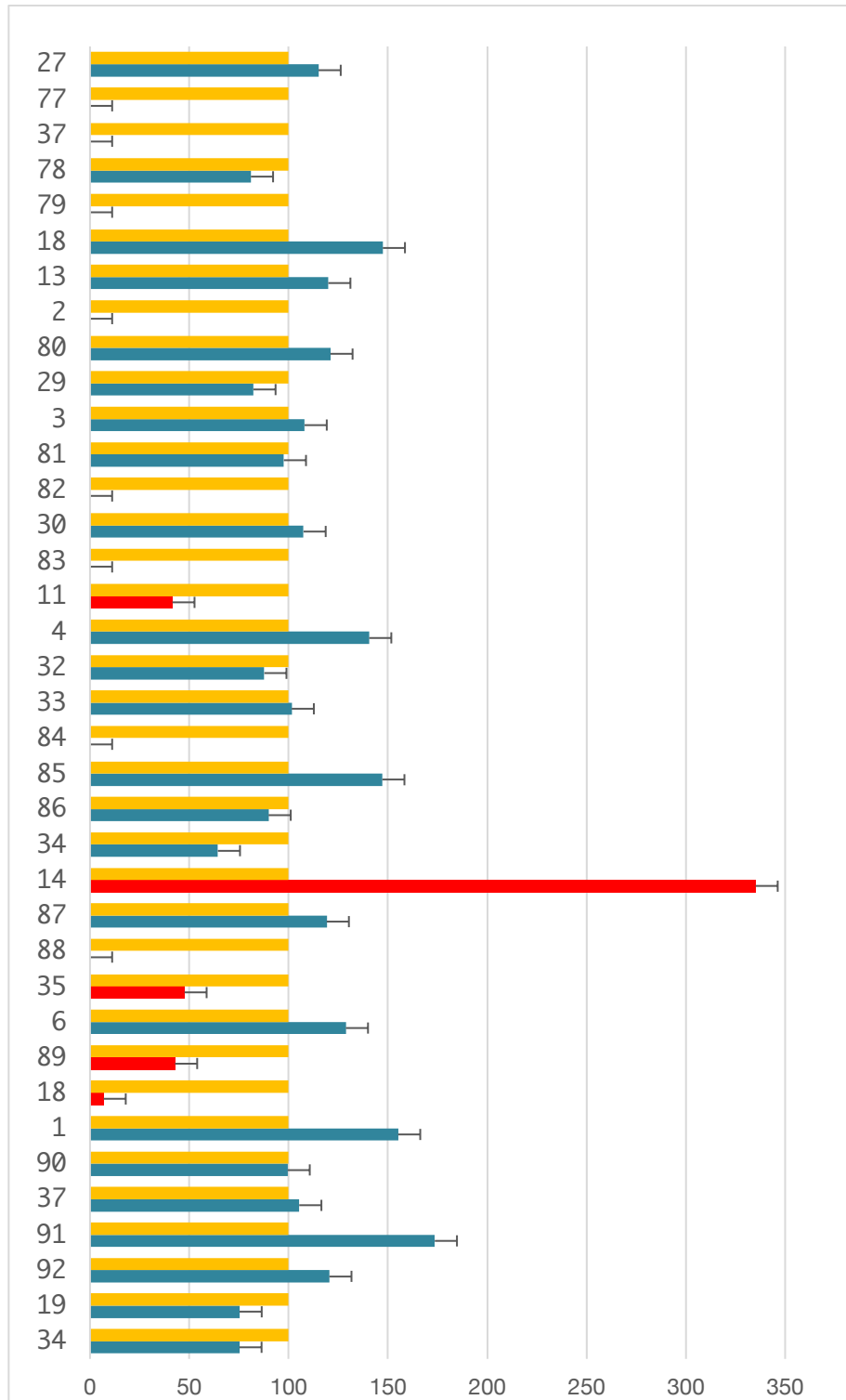


# RESULTADOS



# RESULTADOS





**Figura R27.** Muestras sin RA vs muestras con RA para BNZ. En color rojo se hallan resaltadas las proteínas más relevantes. Eje x: porcentaje.

# DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de los trabajos presentados en esta tesis doctoral, la actividad principal estuvo enfocada en profundizar el conocimiento sobre la farmacocinética y farmacodinamia del benznidazol, con un foco especial en la evaluación del metabolismo, pobremente estudiado hasta el momento, y otros aspectos farmacológicos de esta droga que, a pesar de ser indispensable para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, ha sido muy poco explorada en detalle. Los esfuerzos por comprender mejor la farmacología de este medicamento tienen el potencial implícito de mejorar el tratamiento de los pacientes, ya sea mejorando el uso del medicamento para aumentar la tasa de respuesta, como así modificar los esquemas de tratamiento para disminuir la alta frecuencia de eventos adversos, un problema importante en esta enfermedad.

Los nitroimidazoles son un grupo de compuestos químicos, con propiedades antibacterianas y antiprotozoarias, ampliamente utilizados en diversas patologías. Para poder actuar, requieren la reducción del grupo nitro de la molécula, lo que conduce a la producción de compuestos intermedios inestables y tóxicos que, en el caso de bacterias, afectan el ADN dañándolo y causando muerte celular (Breccia 1982).

El BNZ, es un nitroimidazol que ha sido utilizado por los últimos 50 años como primer línea de tratamiento para la enfermedad de Chagas dada su eficacia antiparasitaria comprobada. Debido a diversos motivos, entre ellos el hecho de que la enfermedad de Chagas es una enfermedad desatendida, sumado a la suspensión de la producción de la droga por parte del laboratorio que la comercializaba, el BNZ no ha sido estudiado farmacológicamente en profundidad. Frente a la

ausencia de nuevas drogas eficaces para el tratamiento de la enfermedad, la comunidad médica continuó utilizando BNZ a pesar de la carencia de estudios y de datos farmacológicos. Si bien existe evidencia sobre el metabolismo de otras drogas de la familia de los nitroimidazoles, en el caso del BNZ hay pocos estudios *in vivo* en humanos, hallándose estudios antiguos que describen la presencia de un producto de nitroreducción en orina de perro, rata, mono y humano (Breccia 1982).

El conocimiento preciso del metabolismo de una droga es de suma importancia por su influencia directa en la eficacia, pautas de dosificación, intervalo de administración e interacciones medicamentosas. Por este motivo, se decidió realizar un estudio en orina de pacientes con enfermedad de Chagas en estadio crónico bajo tratamiento con BNZ, a fin de detectar BNZ e identificar productos de su biotransformación. Con estos fines se trabajó con la tecnología de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), ya que para el estudio del metabolismo de drogas es una de las herramientas más utilizadas dada su ductilidad y la posibilidad de emplear diversos enfoques de análisis con resultados de alta precisión.

#### **Parte I. Muestras de orina de pacientes con enfermedad de Chagas en tratamiento con BNZ: detección y cuantificación de la droga e identificación de sus metabolitos.**

En este trabajo se logró cuantificar que un porcentaje menor al 2% de la dosis total de BNZ en todas las muestras de orinas de 24 horas de pacientes. Teniendo en cuenta que la dosis diaria de BNZ son 400mg y que los volúmenes de las muestras de orina fueron entre 1.1 y 2

litros, si la droga no se metabolizase se deberían haber hallado concentraciones de entre 363 y 200 mg/L de orina. Los resultados obtenidos en las cuantificaciones se encontraron lejos de esos valores siendo el valor promedio 2.09 mg/L de orina, lo que permite inferir que la droga ha sido metabolizada, y excretada en orina en mayor medida como productos de biotransformación, sin dejar de contemplar la posibilidad de excreción del BNZ por otras vías como la biliar o fecal. Los resultados describen una tasa alta de metabolismo de alrededor del 99%, asumiendo que no haya acumulación en grasa o tejidos, lo que, aunque no se pueda descartar completamente, es poco probable que ocurra en concentraciones significativas que alteren la estimación de metabolismo de BNZ y excreción urinaria de los metabolitos.

El análisis exploratorio no dirigido en HPLC-MS/MS por escaneo EMS arrojó un elevado número de iones que presentaron gran intensidad, requiriéndose el filtrado de aquellos de interés. Entre los iones sin relevancia para este estudio se encuentran aquellos presentes en todas las muestras, constituyendo lo que se denomina “background” (intensidad de fondo o ruido), y aquellos presentes solamente en algunos de los controles, cuya presencia podría tener origen en diferentes causas como el consumo de medicaciones específicas o productos derivados de la dieta, entre otras cosas. Si bien aumentar el tamaño muestral permitiría que iones específicos de algunos controles diluyan su presencia, además de acceder a un análisis estadístico inferencial, no disminuiría necesariamente el *background*, por lo que su supresión requirió llevar a cabo un contraste entre orinas de pacientes y controles.

Los iones descritos exclusivamente en orinas de pacientes fueron analizados como potenciales metabolitos mediante búsquedas dirigidas MS/MS y escaneos NL. En el caso de los metabolitos de Fase I, fueron caracterizados mediante el análisis de patrones de fragmentación, es decir, sometiendo los iones a diferentes energías de colisión con el objetivo de adjudicar picos del patrón a fragmentos ionizados de la molécula producto de su ruptura. La identificación en orina de los principales metabolitos de BNZ, además de justificar cualitativamente la fracción de droga hallada de la dosis total diaria administrada, corroboró la existencia de productos nitroreducidos, como es el caso de la forma completamente reducida (aminoBNZ,  $m/z$  231.1), que se hallaba previamente descrita solo en ensayos *in vitro* en condiciones hipóxicas con tejidos de ratón y también *in vivo*, en orinas y tejidos de ratones tratados con BNZ (Masana et al. 1984; Walton and Workman 1987; Workman et al. 1986); y el caso de la forma parcialmente nitroreducida ( $m/z$  247.1).

En este trabajo se han hallado en distintas ocasiones múltiples picos cromatográficos para una misma búsqueda dirigida por MRM, planteando la existencia de isómeros estructurales. Un ejemplo es el del metabolito  $m/z$  247.1 que presenta dos potenciales estructuras basadas en diferentes ubicaciones del -OH sobre el anillo pirrol. Otro ejemplo, es el metabolito dihidro-dihidroxiBNZ ( $m/z$  265.1) que describe también dos picos cromatográficos diferentes, si bien el análisis MS/MS no fue capaz de determinar si corresponden a isómeros estructurales, asumiendo que la locación del -OH es la responsable de la pequeña variación en los tiempos de retención, existe una gran posibilidad de que sean isómeros *cis* y *trans* (Hall and Wilkinson 2012).

Para los metabolitos de Fase II, el escaneo por NL resultó en la confirmación de la identidad de metabolitos conjugados con ácido



glucurónico y cisteína respectivamente, descartando la posibilidad de que el BNZ sufra un metabolismo de conjugación directo de manera significativa, pero confirmando que sus metabolitos son eliminados, en buena medida, como formas conjugadas. Esto no había sido observado hasta el momento, y provee una perspectiva nueva en la evaluación de la toxicidad del BNZ en pacientes. Tomando en cuenta el valor potencial de la conjugación de los metabolitos reactivos de BNZ con donante de tioles como el glutati6n o la cisteína, se abre la posibilidad de evaluar el uso de estas de moléculas como por ejemplo la N-acetilcisteína para intentar reducir la toxicidad, entre otras posibles nuevas vías de investigación abiertas por estas observaciones.

Tras la identificación de los principales productos metabólic6s de BNZ, aquellos con mayor intensidad fueron seleccionados para ser sometidos a un análisis por MS de alta resoluci6n cuya precisi6n en la detecci6n de la relaci6n masa/carga es mayor, alcanzando los 4 decimales. El empleo de MS de alta resoluci6n como técnica alternativa de detecci6n confiere una evidencia confirmatoria de las identidades planteadas previamente.

Todos los metabolitos provenientes del metabolismo de Fase I descritos en este trabajo, coinciden con los identificados en estudios de metabolismo parasitario (Hall and Wilkinson 2012; Trochine et al. 2014), hallándose incluso los isómeros cis y trans para el metabolito 4,5-dihidro-4,5-dihidroimidazol con relaci6n m/z 265.1. La generaci6n, en *T. cruzi* en fase epimastigote, de N-bencil-2-guanidinoacetamida, de relaci6n m/z 207.1, se fundamenta como el resultado de la ruptura de 4,5-dihidro-4,5-dihidroimidazol y posterior libe-

ración de glioxal, un dialdehído capaz de formar aductos con proteínas, ADN y moléculas pequeñas como glutatión (Hall and Wilkinson 2012).

## Parte II. Metabolismo mamífero *in vitro* de BNZ.

El BNZ ha sido, durante muchos años, objeto de interés por demostrar la capacidad de potenciar drogas citotóxicas utilizadas para el tratamiento de tumores en patologías de cáncer (Li, Lin, and Yun 2016; Roberts et al. 1984; Roberts and Bleehen 1985; Siemann, Morrissey, and Wolf 1983; Twentyman and Workman 1983; Workman et al. 1986). Esta característica focalizó los estudios de metabolismo *in vitro* en condiciones anaerobias, empleando atmósferas saturadas de gas nitrógeno o bien en condiciones de hipoxia, a fin de emular los ambientes tumorales (Masana et al. 1984; Walton and Workman 1987; Workman et al. 1986). Estos estudios determinaron que el BNZ es metabolizado en sistemas *in vitro* bajo condiciones hipóxicas describiendo reacciones altamente dependientes del cofactor NADPH, inhibibles extensamente en presencia de aire y que involucran nitroreductasas susceptibles a oxígeno, es decir, funcionales en ausencia de oxígeno o tipo I. La necesidad de estudiar el metabolismo de la droga en condiciones que se asemejen a las fisiológicas regulares, fue el motivo de desarrollar los ensayos *in vitro* con microsomas hepáticos de distintas especies mamíferas, a fin de abarcar una mayor diversidad.

Se logró demostrar que el BNZ es metabolizado por microsomas hepáticos en condiciones aerobias, sugiriendo una biotransformación catalizada por enzimas dependientes de NADPH e insensibles a oxígeno. Con respecto a los metabolitos, se detectaron en los estudios con microsomas todos los metabolitos de Fase I hallados previamente en

Los estudios de muestras de orina humana de pacientes tratados con BNZ (ver Sección Resultados 1.2.), lo que permite plantear la existencia de isoformas de funcionalidad, responsables de los distintos pasos de biotransformación que estarían presentes, en todas las especies estudiadas, incluyendo la humana.

Al igual que en las muestras de orina humana (Sección Resultados 1.2.), para los microsomas hepáticos de rata y cerdo, el metabolito con mayor intensidad fue el completamente nitroreducido ( $m/z$  231.1), mientras que para microsomas de ratón fue el  $m/z$  265.1. Tanto las diferencias en los porcentajes de BNZ metabolizado como las diferencias en las proporciones de metabolitos, podrían deberse a la variabilidad enzimática característica de cada especie.

Las UDP-glicosiltransferasa son las principales enzimas de Fase II presentes en diversos seres vivos, cuya función es catalizar la conjugación de pequeños compuestos lipofílicos con azúcares. Las UGT, son una superfamilia de enzimas definidas por una estructura proteica común y una secuencia de 44 aminoácidos responsables de llevar a cabo la conjugación con la porción UDP del azúcar donante (Mackenzie et al. 1997). A menudo, el azúcar empleado en estas reacciones es ácido glucurónico, motivo por el cual las UGT suelen ser generalizadas como UDP-glucuroniltransferasas. Dos de las reacciones más importantes catalizadas por estas enzimas son la O y N-glucuronidación, cuya clasificación se basa en el átomo al que queda unido el ácido glucurónico tras la conjugación. En particular, la N-glucuronidación (como es el caso del  $m/z$  407.1), suele ser llevada a cabo por isoformas especializadas en este tipo de conjugación, siendo las más importantes en este rol UGT1A4 y UGT2B10 (Kaivosari, Finel, and Koskinen 2011) y siendo esta última altamente específica en

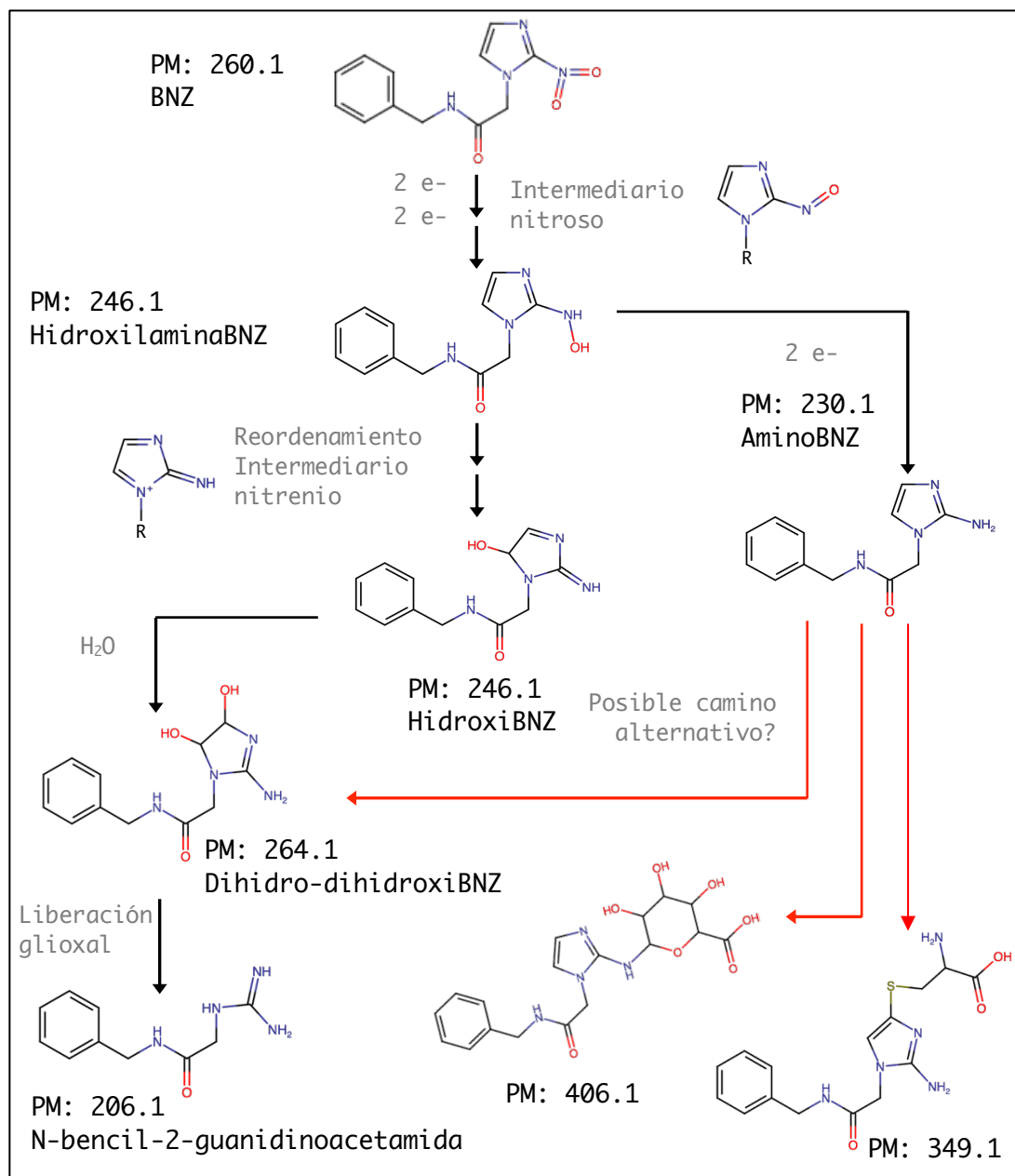
reacciones que involucren compuestos aromáticos N-heterocíclicos como el BNZ (Zhou et al. 2010). Lamentablemente, en nuestros ensayos de metabolismo de BNZ mamífero *in vitro* no detectamos metabolitos conjugados con ácido glucurónico a pesar de haber empleado el co-factor necesario (UDPGA). Las reacciones de N-glucuronidación prevalecen en humanos por sobre animales de laboratorio, y si bien se desconoce que isoforma humana de UGT es la responsable de la conjugación de metabolitos de BNZ, es preciso destacar que no hay genes ortólogos de UGT2B10 en animales de laboratorio, lo que limita su acción a humanos y primates superiores (Kaivosari et al. 2011). Es posible que la razón de no haber detectado metabolitos de BNZ conjugados en los ensayos *in vitro* este relacionada a esta ausencia. No obstante, no podemos descartar otras posibles explicaciones que contemplan la presencia de la isoforma UGT responsable en los microsomas empleados, como por ejemplo una baja concentración de metabolitos de Fase I, que podría ser insuficiente para obtener una concentración de conjugados por encima del límite de detección, o bien otras variables, como la concentración específica de enzima por gramo de proteína total o la pérdida de actividad que podrían jugar roles importantes.

La descripción del origen de cada uno de los metabolitos de BNZ es fundamental para dilucidar la vía metabólica, con este objetivo y a fin de comprender su síntesis *in vitro*, se llevó a cabo el estudio de cinética de metabolitos. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron contrastados fundamentalmente con los trabajos de Hall & Wilkinson 2012 y Trochine et al 2014, que plantean potenciales caminos metabólicos para BNZ utilizando cultivos de parásitos *T. cruzi* en fase epimastigote y nitroreductasas aisladas de parásitos (Figura D1). Estos autores coinciden en que el BNZ sufre una nitroreducción

parcial, que origina la hidroxilaminaBNZ (m/z 247.1), mediante una reacción de dos pasos que incorpora 4 electrones, con un intermedio nitroso. Este primer metabolito, en condiciones neutras sería capaz de reordenarse a través de un ion nitrenio para formar un derivado hidroxilado o hidroxibNZ (m/z 247.1).

El metabolito completamente nitroreducido aminoBNZ (m/z 231.1) se originaría tras la reducción de la hidroxilaminaBNZ, mientras que el metabolito dihidro-dihidroxibNZ (m/z 265.1) sería un producto más estable resultado de la adición de una molécula de agua por parte del -OH del hidroxibNZ. Finalmente, el metabolito de menor peso molecular, el N-bencil-2-guanidinoacetamida (m/z 207.1), sería el producto obtenido tras la liberación de glioxal, un potente agente citotóxico y mutagénico, del dihidro-dihidroxibNZ (Panicucci and McClelland 1989; Trochine et al. 2014).

En lo que respecta al estudio de cinética *in vitro*, por un lado, se verificó el modelo logístico para aminoBNZ y dihidro-dihidroxibNZ, apareciendo ambos primero que los productos parcialmente nitroreducidos y con una pendiente mayor para el amino-BNZ. En base al camino metabólico teórico comentado previamente, la hidroxilaminaBNZ debería ser el primer metabolito que aparece en el tiempo, seguido de aminoBNZ y dihidro-dihidroxibNZ, sin embargo esto no ocurrió en nuestro ensayo. Una posible explicación podría basarse en que la vía metabólica BNZ- HidroxilaminaBNZ - AminoBNZ, sea lo suficientemente rápida como para no llegar a detectar, en el sistema diseñado, a la hidroxilaminaBNZ. En ese caso, la nueva pregunta que se origina es a que estructuras corresponden los dos iones con m/z 247.1 detectados, y la respuesta podría tener origen en la posibilidad de estar detectando el hidroxibNZ y el ion intermediario nitrenio.



**Figura D1.** Camino metabólico teórico de BNZ basado en los trabajos de Hall & Willkinson 2012 y Trochine et al 2014 representado por flechas negras. En flechas rojas se adicionaron potenciales alternativas y los metabolitos de Fase II.

Es preciso recordar que mediante la técnica de espectrometría de masas se obtienen relaciones de masa/carga, por lo que el estudio de

especies iónicas que involucren isómeros se ve dificultado debido a la imposibilidad de identificarlos.

Otra alternativa posible es la síntesis dedihidro-dihidroxiBNZ mediante una doble hidroxilación del anillo pirrol a partir de aminoBNZ (Figura D1), lo que también explicaría las pendientes obtenidas por el modelo logístico.

### Parte III. Modelo murino de farmacocinética poblacional de BNZ

El modelo agudo murino de enfermedad de Chagas, empleando ratones, es el más utilizado y estudiado por la comunidad científica, existiendo un gran consenso sobre su empleo. Las potenciales drogas candidatas a nuevos tratamientos, tras evaluarse en la fase *in vitro*, pasan a ser evaluadas en modelos *in vivo*, momento en donde se implementa el modelo agudo murino de infección, con BNZ como control positivo de tratamiento. A pesar de su frecuente uso, no se cuenta con la información farmacocinética detallada que verifique las extrapolaciones de resultados a humanos e incluso las dosis empleadas. Por otro lado, considerando que los cambios fisiológicos que acompañan a un estado inflamatorio pueden alterar la farmacocinética de una droga resulta de gran utilidad estudiar el comportamiento del BNZ en animales infectados y no infectados.

En este trabajo se ha desarrollado un modelo farmacocinético poblacional de BNZ, de un compartimiento, en un modelo murino de infección aguda por *T. cruzi*, empleado una novedoso método de sampleo, mínimamente invasivo, que permitió tomar múltiples muestras de un mismo ratón, evitando emplear un animal para cada muestra de sangre por tiempo.

Los resultados obtenidos muestran parámetros farmacocinéticos similares en ambos grupos de animales, infectados y sanos, a excepción

del volumen de distribución que fue mayor en los animales infectados (37.6 ml en infectados vs 24.9 ml en controles). El volumen de distribución es un parámetro obtenido por la relación entre la cantidad total de droga administrada y la concentración plasmática de la misma, que puede verse afectado por diversos factores, como la unión de la droga a proteínas plasmáticas o la acumulación en tejido adiposo entre otros. Dentro de los factores patológicos, los edemas, por ejemplo, aumentan el volumen de distribución (principalmente de las drogas hidrosolubles). El daño hepático que altera el flujo sanguíneo hepático, la actividad enzimática y la unión a proteínas, puede afectar el volumen de distribución de diversas formas, por ejemplo, la producción de albúmina y  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida puede verse alterada, distorsionando su conformación, lo que resulta en una menor afinidad de unión (Israïli and Dayton 2001). Tanto los niveles más bajos de proteína como la unión alterada pueden dar lugar a una menor unión a las proteínas plasmáticas, lo que lleva a un aumento del volumen de distribución (Verbeeck 2008). En el caso del BNZ, que es una droga liposoluble y con una unión a proteínas plasmáticas mayor al 40% (Morilla and Romero 2015), el aumento del volumen de distribución en animales infectados, podría estar relacionado entonces al daño hepático o extravasación de plasma a tejidos por mecanismos inflamatorios. Este efecto, sobre el volumen de distribución, no se tiene en cuenta comúnmente cuando se diseñan estudios en animales, dado que la mayoría de los estudios de PK se han realizado en animales no infectados, lo que puede sesgar los resultados al minimizar la exposición sistémica al medicamento. No obstante, aún con diferencias significativas para el volumen de dis-



tribución de ambos grupos, se garantiza que las concentraciones obtenidas en este modelo reflejan las requeridas para la efectividad del fármaco durante la infección.

La vida media observada en ratones fue, como es esperable, diferente que la reportada en humanos, es decir, 1.1 a 1.6 horas vs 12 horas en humanos adultos respectivamente, (Molina et al. 2017; Müller Kratz et al. 2018; Raaflaub 1980; Raaflaub and Ziegler 1979; Soy et al. 2015) mostrando que la eliminación de la droga es más rápida que en humanos, como es de esperarse en animales pequeños con alta tasa metabólica.

La concentración máxima en el modelo murino ( $C_{max}=67.6$  mg/L) también fue mayor que en humanos (2.29 mg/L Raaflaub & Ziegler 1979, 7.49 mg/L Soy et al 2015, 2.2 mg/L Molina et al 2017) e incluso moderadamente mayor a la informada en la bibliografía para ratones en otros modelos (41.61 mg/L Perin et al. 2017).

El valor obtenido de clearance ( $Cl=0.0163$  L/h) fue similar al obtenido en otros trabajos con ratones sanos ( $Cl= 0.01329$  L/h, Perin et al 2017), pero muy diferente a los valores calculados para humanos (2.09 L/h (Raaflaub and Ziegler 1979), 1.7 L/h (Soy et al. 2015), 2.2 L/h (Molina et al. 2017)). Al igual que con los ratones, para estimar el clearance, se asume un peso estimado que en humanos es 70 kg, por lo tanto, al comparar los valores corregidos por peso, el clearance murino es alrededor de 25 veces mayor que el calculado en humanos. Además, la vida media del BNZ en ratones es entre 1.1 y 1.6 horas mientras que en humanos ronda las 12 horas. Ambos parámetros demuestran una eliminación del fármaco más rápida, lo que sugiere que una dosis diaria en ratones puede ser insuficiente para mantener las concentraciones requeridas a fin de eliminar completamente los parásitos, no obstante, también confirma la potencia del BNZ contra

los parásitos circulantes, ya que a pesar de que se esperan bajas concentraciones de BNZ durante la mayor parte del día con la dosificación diaria, estas son suficientes para eliminar los parásitos circulantes. Esta observación pone en tela de juicio la necesidad de mantener una concentración mínima durante todo el día como se plantea en algunos esquemas de tratamiento de la enfermedad de Chagas (como la administración de BNZ dos veces por día). Este requerimiento de mantener una concentración mínima, derivada de los esquemas de tratamiento anti-bacteriano, parecerían no reflejar la actividad farmacológica del BNZ contra el parásito.

Estos resultados deberían proporcionar una base para un mayor refinamiento de la dosificación de BNZ en modelos de ratones para mejorar los resultados en modelos de infección aguda.

Durante la fase aguda de la enfermedad, la forma tripomastigote de *T. cruzi*, puede ser hallada en la sangre del hospedador, sin embargo, el estadio amastigote del parásito persiste de manera latente en órganos durante décadas generando un daño progresivo. La hipótesis sobre la falla terapéutica del BNZ, durante la fase crónica de la enfermedad, se basa en el planteo de que la droga no llega correctamente a tejidos, sin embargo, este estudio ha demostrado que el BNZ es detectado a nivel tisular con una sola dosis oral. Generalmente se considera que la dosis terapéutica óptima para eliminar parásitos intracelulares y extracelulares es entre 3 y 6 ug/ml (Richle and Raaflaub 1980), bajo este concepto, el BNZ alcanzó concentraciones superiores a 3 mg/g de tejido en algunos órganos (músculo esquelético y pulmón) en el primer horario medido. No obstante, a fin de evaluar la penetración tisular a largo plazo, se deberían llevar a cabo estudios de regímenes multidosis. Por otro lado, el dihidro-dihidroxiBNZ y el aminoBNZ fueron detectado en todos

los órganos, hallándose en mayores concentraciones en corazón y pulmón. Si bien los valores mencionados corresponden a pseudo concentraciones, es decir, valores obtenidos a partir de la curva de calibración hecha a partir de la droga madre, los mismos fueron ampliamente mayores a los detectados para el BNZ. Muchas enzimas presentes en el hígado, como las CYP450 y aldehído oxidasa, se hallan expresadas en otros tejidos, por lo que no puede descartarse la posibilidad de metabolismo *in situ*.

Las prodrogas son fármacos que requieren ser metabolizados para tener actividad, el BNZ es ampliamente reconocido como tal y su biotransformación en el parásito resulta en la formación de una batería de metabolitos potencialmente citotóxicos en los que se basa su acción parasiticida. Por este motivo es de suma importancia investigar si estos metabolitos hallados en tejidos, son activos, es decir, si tiene actividad antiparasitaria.

#### **Parte IV. Metabolismo parasitario *in vitro* de BNZ.**

Una primer diferencia entre el metabolismo parasitario y mamífero, se observa en la ausencia de productos de biotransformación conjugados con ácido glucurónico, dado que ninguno ( $m/z$  407.1 y  $m/z$  423.1) fue detectado en los ensayos con parásitos. Diversos estudios han identificado distintas familias de UGT en mamíferos, nematodos, artrópodos, hongos y bacterias (Mackenzie et al. 1997), y si bien se han detectado pools de ácido glucurónico en *T. cruzi* hasta el momento no se ha hallado en su genoma ningún gen que codifique para UDP-glucuroniltransferasa (Turnock and Ferguson 2007). Posiblemente, este sea el motivo por el cual no se han detectado los metabolitos de BNZ conjugados con ácido glucurónico en los ensayos *in vitro* de metabolismo parasitario.

Por otro lado, estudios de metabolómica no dirigida en tripanosomátidos han descubierto que aminoderivados de BNZ, como el aminoBNZ, son conjugados con otros tioles como glutatión, ovotiol, gama-glutamylcisteína o tripanotión (molécula exclusiva de kinetoplastidos, compuesta por dos moléculas de glutatión unidas por espermidina, Fairlamb et al 1985), que luego forman aductos mediante uniones covalentes (Trochine et al. 2014). Estos hallazgos, que se hallan apoyados por la depleción de tioles endógenos descrita tras la utilización de BNZ en parásitos (Buschini et al. 2009; Maya et al. 2003; Trochine et al. 2014) son también la base de la hipótesis que plantea esta vía como una de las principales de toxicidad contra *T. cruzi*. En nuestro trabajo se han hallado en mayor concentración al metabolito dihidro-dihidroxiBNZ, quien luego por liberación de glioxal genera N-bencil-2-guanidinoacetamida, y al conjugado con cisteína (m/z 350.1), sin lograr detectar aminoBNZ. Tras incubar 24 horas, es posible que el aminoBNZ no sea detectable debido a que se encuentra completamente conjugado con otros tioles, como la cisteína, y otros que no se han buscado en este trabajo.

No obstante, sería muy importante realizar estudios de metabolómica no dirigida, especialmente en parásitos en fase tripomastigote a fin de completar la caracterización del metabolismo parasitario.

#### **Parte V. Estudio retrospectivo y exploratorio de biomarcadores predictores de eventos adversos.**

El empleo de la proteómica como técnica de detección e identificación de biomarcadores circulantes, se ha expandido ampliamente en diversos campos de la medicina. Entre ellos, resulta de gran utilidad la

posibilidad de detectar biomarcadores en el contexto de predicción de diversos eventos adversos (EA).

En esta trabajo se llevó a cabo un estudio retrospectivo, empleando muestras de pacientes con enfermedad de Chagas, tratados con BNZ o NFX, que hubiesen sufrido reacciones adversas (RA) o no. A fin de detectar potenciales biomarcadores circulantes, que pudiesen predecir la aparición de EA, se colectaron, de la seroteca del Servicio de Parasitología y Chagas del HNRG, muestras de suero de pacientes en tratamiento que no sufrieron RA (sin RA), muestras de pacientes que sufrieron RA, durante el transcurso del mismo (con RA) y previo al inicio del tratamiento (pre-tratamiento). Debido a que el proteoma correspondiente al grupo con RA, de seguro se presentaría un proteoma con un perfil de proteínas inflamatorias, se llevaron a cabo las comparaciones entre los grupos sin RA y pre-tratamiento. Como criterio para seleccionar potenciales candidatos a ser biomarcadores predictivos de RA, las condiciones fueron: que la proteína se halle regulada en el grupo con RA al comparar con el grupo sin RA, y que se hallase regulada en el grupo pre-tratamiento al comparar con el grupo sin RA, de esta forma se descarta la expresión se deba exclusivamente a la inflamación.

Mediante el enfoque de Top Down, para el BNZ se hallaron dos proteínas reguladas significativamente, la  $\alpha$ -1-antiquimiotripsina y la transtiretina, aunque solamente la segunda cumplió con las condiciones descritas previamente para ser seleccionada como potencial candidata. La transtirretina entonces podría ser una proteína presente exclusivamente en individuos que presentaron RA, dado que halló regulada tanto en el grupo con RA, como en el grupo pre-tratamiento. Esta proteína, cuya función es transportar hormona tiroidea, y la proteína de unión al retinol (cuando esta conjugada con retinol),

forma parte de las llamadas proteínas reactantes de fase aguda, cuya característica principal es su variación en la concentración plasmática frente a procesos inflamatorios. En el caso de la transtirretina, usualmente disminuye su concentración en inflamación aguda, lo que no se condice con los resultados obtenidos.

El enfoque por Bottom Up, se hallaron proteínas reguladas en el grupo con RA al comparar con el grupo sin RA, sin embargo, las mismas no fueron halladas luego reguladas en el pre-tratamiento al comparar con el grupo sin RA, por lo que no cumplieron las condiciones del criterio de selección.

En el caso de NFX, mediante Top Down, se hallaron cinco proteínas reguladas significativamente, apolipoproteína A1, alfa 1 antiqumiotripsina, cadena alfa de fibrinógeno, hemoglobina y serina/treonina proteína quinasa. Solamente la apolipoproteína A1, cumplió con criterio de selección a fin de postularse como potencial candidato a biomarcador predictivo de RA.

Para el enfoque por Bottom up, las siguiente proteínas cumplieron el criterio de selección: proteína de zona de embarazo (8), subunidad beta (9) y alfa (10) de hemoglobina y MS-D1 cadena liviana región variable (21).

Tanto para BNZ como para NFX, los resultados no fueron congruentes entre el análisis " Top Down" y" Bottom Up", dado que no hubo candidatos identificados por ambos enfoques de análisis. Esto puede deberse a varios motivos que van desde la estadística, por el limitado tamaño muestral, a lo netamente bioquímico, que podría resolverse llevando a cabo más purificaciones, pero fundamentalmente separando el suero en fracciones por cromatografías de exclusión molecular. Fundamentalmente para el análisis por Top Down, que analiza

proteínas intactas, emplear fracciones de suero puede mejorar significativamente el número de proteínas a identificar. No obstante, el hecho de haber empleado sueros provenientes de una seroteca, agrega más factores que pueden aumentar la variabilidad entre los mismos (sueros con diferente antigüedad y diferente número de ciclos de congelado-descongelado).

Como conclusión, este estudio debería llevarse a cabo de manera prospectiva, a fin de controlar fuentes de variación, con un mayor tamaño muestral y una preanalítica de las muestras más intensiva. Además, a fin de agregar un segundo criterio de selección, sería de gran utilidad en el futuro agregar un cuarto grupo formado por sueros de pacientes pre-tratamiento y que no hayan sufrido RA, de esta forma podría buscarse proteínas que se hallen expresadas en el pre tratamiento de personas que sufrieron RA comparando estadios previos a la ingesta de la droga tanto en individuos que sufrieron RA como individuos que no. Esto descartaría la influencia de la ingesta de la droga sobre la expresión de proteínas.

# CONCLUSIÓN



El descubrimiento y posterior comercialización de fármacos es un proceso extremadamente largo, complejo y costoso. En promedio, desde que una molécula es identificada como potencial candidato hasta que la misma se comienza a comercializar, transcurren alrededor de 15 años con inversiones financieras que superan los miles de millones de dólares. Los estudios requeridos por las agencias regulatorias, como la FDA (Food and Drugs Administration) o la EMA (European Medicines Agency) entre otras, varían entre los diferentes países pero a grandes rasgos requieren estudios *in vitro* e *in vivo* de metabolismo, farmacocinética, farmacodinamia y toxicología. Para poder comenzar con estudios en humanos, se deben coleccionar suficiente evidencia científica durante la fase pre clínica demuestren la eficacia y seguridad de la droga. Aún con estos estándares puede ocurrir que una droga llegue a la fase clínica y sea descartada por diversos motivos.

En el caso del BNZ, los estudios farmacológicos pre clínicos y clínicos no fueron suficientes hallándose grandes ausencias de información, posiblemente debido a que las normas regulatorias desde aquel entonces han ido evolucionando y volviéndose más estrictas y exigentes, siendo impensado en la actualidad, que una droga salga al mercado debiendo este tipo estudios cruciales. Otro motivo, ajeno a las regulaciones, que dificultó continuar la caracterización de la droga es el carácter socioeconómico de la enfermedad de Chagas, la misma afecta poblaciones carenciadas dentro de países no desarrollados y en vías de desarrollo. La ausencia de políticas de estado sumado a la falta de interés de las compañías farmacéuticas por no representar un mercado que genere ganancias, han hecho que la enfermedad de Chagas sea calificada como enfermedad olvidada.

En este trabajo, se logró identificar los principales productos de biotransformación de BNZ utilizando métodos *in vitro* e *in vivo*, con diferentes especies mamíferas, incluyendo muestras de orina de pacientes con enfermedad de Chagas. Los resultados mostraron de manera contundente que el BNZ es metabolizado en el hígado, a diferentes productos de nitroreducción, por enzimas de Fase I para luego ser conjugado por enzimas de Fase II. Por otro lado, se estudió el metabolismo parasitario del BNZ, hallando metabolitos previamente descritos en el metabolismo mamífero, lo que demuestra la existencia de puntos en común entre el metabolismo mamífero y parasitario. Sin embargo, la identificación de conjugados con ácido glucurónico, establece la principal diferencia entre el metabolismo mamífero y parasitario, y lo que podría ser la principal vía de detoxificación en mamíferos.

Este trabajo también logró desarrollar un modelo de farmacocinética poblacional, en un modelo murino de infección aguda, hallando grandes diferencias entre los parámetros farmacocinéticos de modelos en humanos vs modelos murinos lo que debería sugerir cambios en los regímenes de administración y en las dosis empleadas experimentalmente.

Los resultados presentados, desde la evidencia de metabolismo de fase I y II, hasta las observaciones en el modelo murino y finalmente, los hallazgos iniciales en el estudio de biomarcadores proteómicos, agregan información para avanzar en el mejoramiento de los tratamientos para la enfermedad de Chagas. Es mi esperanza que este esfuerzo, en combinación con estudios clínicos en humanos y avances en los modelos murinos, contribuya a mejorar la atención a los pacientes con esta enfermedad desatendida.

# BIBLIOGRAFÍA

- Aarons, L. 1991. "Population Pharmacokinetics: Theory and Practice." *British Journal of Clinical Pharmacology* 32(6):669–70.
- Almeida-de-Faria, M., E. Freymüller, W. Colli, and M. J. M. Alves. 1999. "Trypanosoma Cruzi: Characterization of an Intracellular Epimastigote- like Form." *Experimental Parasitology* 92(4):263–74.
- Altchek, Jaime, Guillermo Moscatelli, Samanta Moroni, Facundo Garcia-Bournissen, and Hector Freilij. 2011. "Adverse Events After the Use of Benznidazole in Infants and Children With Chagas Disease." *Pediatrics* 127(1):212–18.
- Aronson, Jeffrey K. and Robin E. Ferner. 2016. "The Law of Mass Action and the Pharmacological Concentration-Effect Curve: Resolving the Paradox of Apparently Non-Dose-Related Adverse Drug Reactions." *British Journal of Clinical Pharmacology* 81(1):56–61.
- Aronson, Jeffrey K. and Robin E. Ferner. 2017. "Biomarkers - a General Review." *Current Protocols in Pharmacology* 2017(March):9.23.1-9.23.17.
- Bern, Caryn. 2015. "Chagas' Disease." *The New England Journal of Medicine* 373(5):456–66.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72(1–2):248–54.
- Brasil, Pedro E. A. A., Liane De Castro, Alejandro M. Hasslocher-Moreno, Luiz H. C. Sangenis, and José U. Braga. 2010. "ELISA versus PCR for Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Systematic Review and Meta-Analysis." *BMC Infectious Diseases* 10(1):337.
- Breccia, A. 1982. "Chemical Properties and Reaction Mechanisms of

- Nitroimidazoles.” Pp. 35–48 in *Nitroimidazoles: Chemistry, Pharmacology, and Clinical Application*, edited by A. Breccia, B. Cavalleri, and G. E. Adams. Boston, MA: Springer US.
- Brener, Z. 1971. “Life Cycle of *Trypanosoma Cruzi*.” *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 13(3):171–78.
- Buschini, Annamaria, Lisa Ferrarini, Susanna Franzoni, Serena Galati, Mirca Lazzaretti, Francesca Mussi, Cristina Northfleet de Albuquerque, Tânia Maria Araújo Domingues Zucchi, and Paola Poli. 2009. “Genotoxicity Revaluation of Three Commercial Nitroheterocyclic Drugs: Nifurtimox, Benznidazole, and Metronidazole.” *Journal of Parasitology Research* 2009:1–11.
- Carlier, Y. and C. Truyens. 2017. *Maternal-Fetal Transmission of Trypanosoma Cruzi*. Second Edi. Elsevier Inc.
- CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades). n.d. “Epidemiología y Factores de Riesgo.” Retrieved January 31, 2019 (<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/epidemiologia.html>).
- Chatelain, Eric and Nandini Konar. 2015. “Translational Challenges of Animal Models in Chagas Disease Drug Development: A Review.” *Drug Design, Development and Therapy* 9:4807–23.
- Cheng, Q. and F. P. Guengerich. 2013. *Cytochrome P450 Protocols*. Vol. 987.
- Coura, J. R., J. C. P. Dias, A. C. C. Frasc, F. Guhl, J. O. Lazzari, M. Lorca, C. Monroy Escobar, C. Ponce, A. C. Silveira, G. Velazquez, and B. Zingales. 2002. “Control of Chagas Disease.” *World Health Organization - Technical Report Series* (905):1–99.
- Coura, José Rodrigues. 2015. “The Main Sceneries of Chagas Disease Transmission. The Vectors, Blood and Oral Transmissions - A Comprehensive Review.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 110(3):277–82.

- Coura, José Rodrigues and Solange L. De Castro. 2002. "A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 97(January):3-24.
- Cuba Cuba, Cesar and Evangelina Solange Hidalgo. n.d. "Curso Sobre Enfermadades Vectoriales Para Agentes Comunitarios y Salud." *Ministerio de Salud. Presidencia de La Nación.*
- Diaz de Toranzo, E. G., J. A. Castro, B. M. Franke de Cazzulo, and J. J. Cazullo. 1988. "Interaction of Benznidazole Reactive Metabolites with Nuclear and Kinetoplastic DNA, Proteins and Lipids from Trypanosoma Cruzi." *Experientia* 44:880-81.
- Docampo, Roberto. 1990. "Sensitivity of Parasites to Free Radical Damage by Antiparasitic Drugs." *Chemico-Biological Interactions* 73(1):1-27.
- Echeverría, Luis E., Lyda Z. Rojas, Lauren S. Calvo, Zayne M. Roa, Oscar L. Rueda-Ochoa, Carlos A. Morillo, Taulant Muka, and Oscar H. Franco. 2017. "Profiles of Cardiovascular Biomarkers According to Severity Stages of Chagas Cardiomyopathy." *International Journal of Cardiology* 227:577-82.
- Espinosa, Raúl, Hugo A. Carrasco, Francisco Belandria, Abdel M. Fuenmayor, César Molina, Rodolfo González, and Owen Martínez. 1985. "Life Expectancy Analysis in Patients with Chagas' Disease: Prognosis after One Decade (1973-1983)." *International Journal of Cardiology* 8(1):45-56.
- Fernández, Emilio and Aurora Galván. 2006. "Métodos Para La Cuantificación de Proteínas." *Departamento de Bioquímica* 1-7.
- Filardi, L. S. and Z. Brener. 1987. "Susceptibility and Natural Resistance of Trypanosoma Cruzi Strains to Drugs Used Clinically in Chagas Disease." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81(5):755-59.

- Garavaglia, Patricia Andrea, Marc Laverrière, Joaquín J. B. Cannata, and Gabriela Andrea García. 2016. "Putative Role of the Aldo-Keto Reductase from *Trypanosoma Cruzi* in Benznidazole Metabolism." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(5):2664–70.
- García-Bournissen, Facundo, Jaime Altcheh, Norberto Giglio, Guido Mastrantonio, Carlos Omar Della Védova, and Gideon Koren. 2009. "Pediatric Clinical Pharmacology Studies in Chagas Disease: Focus on Argentina." *Pediatric Drugs* 11(1):33–37.
- Gironès, Núria, Sofía Carbajosa, Néstor a Guerrero, Cristina Poveda, Carlos Chillón-Marinas, and Manuel Fresno. 2014. "Global Metabolomic Profiling of Acute Myocarditis Caused by *Trypanosoma Cruzi* Infection." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(11):e3337.
- Golde, William T., Peter Gollobin, and Luis L. Rodriguez. 2005. "A Rapid, Simple, and Humane Method for Bleeding of Mice.2005.Pdf." 34(9):39–43.
- Gorsky, L. D., D. R. Koop, and M. J. Coon. 1984. "On the Stoichiometry of the Oxidase and Monooxygenase Reactions Catalyzed by Liver Microsomal Cytochrome P-450. Products of Oxygen Reduction." *Journal of Biological Chemistry* 259(11):6812–17.
- Grillo, Mark P. 2015. "Detecting Reactive Drug Metabolites for Reducing the Potential for Drug Toxicity." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 11(8):1281–1302.
- Grunberg, E., G. Beskid, R. Cleeland, W. F. DeLorenzo, E. Titsworth, H. J. Scholer, R. Richle, and Z. Brener. 1967. "Antiprotozoan and Antibacterial Activity of 2-Nitroimidazole Derivatives." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 7:513–519.
- Hall, B. S. and S. R. Wilkinson. 2012. "Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal

- Formation.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(1):115–23.
- Hatsis, Panos, Nigel J. Waters, and Upendra A. Argikar. 2017. “Implications for Metabolite Quantification by Mass Spectrometry in the Absence of Authentic Standards.” *Drug Metabolism and Disposition* 45(5):492–96.
- Howard, E. J., X. Xiong, Y. Carlier, S. Sosa-Estani, and P. Buekens. 2014. “Frequency of the Congenital Transmission of *Trypanosoma Cruzi*: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 121(1):22–33.
- Israïli, Z. H. and P. G. Dayton. 2001. “Human Alpha-1-Glycoprotein and Its Interactions with Drugs.” *Drug Metabolism Reviews* 33(2):161–235.
- Jackson, Yves, Emilie Alirol, Laurent Getaz, Hans Wolff, Christophe Combescure, and François Chappuis. 2010. “Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease.” *Clinical Infectious Diseases* 51(10):69–75.
- Jannin, Jean and Luis Villa. 2007. “An Overview of Chagas Disease Treatment.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102(SUPPL. 1):95–97.
- Kaivosaaari, Sanna, Moshe Finel, and Mikko Koskinen. 2011. “N-Glucuronidation of Drugs and Other Xenobiotics by Human and Animal UDP-Glucuronosyltransferases.” *Xenobiotica* 41(8):652–69.
- Kubata, Bruno Kilunga, Zakayi Kabututu, Tomoyoshi Nozaki, Craig J. Munday, Shunichi Fukuzumi, Kei Ohkubo, Michael Lazarus, Toshihiko Maruyama, Samuel K. Martin, Michael Duszenko, and Yoshihiro Urade. 2002. “A Key Role for Old Yellow Enzyme in the Metabolism of Drugs by *Trypanosoma Cruzi*.” *Journal of Experimental Medicine* 196(9):1241–51.



- Leiby, DA, BA Lenes, MA Tibbals, and MT. Tames-Olmedo. 1999. "Prospective Evaluation of a Patient with Trypanosoma Cruzi Infection Transmitted by Transfusion." *New England Journal of Medicine* 341(16):1235–37.
- Levine, N. D., J. O. Corliss, F. E. G. Cox, G. Deroux, J. Grain, B. M. Honigberg, G. F. Leedale, A. R. Loeblich, J. Lom, D. Lynn, E. G. Merinfeld, F. C. Page, G. Poljansky, V. Sprague, J. Vavra, and F. G. Wallace. 1980. "A Newly Revised Classification of the Protozoa." *The Journal of Protozoology* 27(1):37–58.
- Li, Quhuan, Qun Lin, and Zhong Yun. 2016. "Hypoxia-Activated Cytotoxicity of Benznidazole against Clonogenic Tumor Cells." *Cancer Biology and Therapy* 17(12):1266–73.
- Mackenzie, Peter I., Ida S. Owens, Brian Burchell, K. W. Bock, Amos Bairoch, Alain Bélanger, Sylvie Fournel-Gigleux, Mitchell Green, Dean W. Hum, Takashi Iyanagi, Doron Lancet, Pierre Louisot, Jacques Magdalou, Jayanta Roy Chowdhury, Joseph Ritter, Harry Schachter, Thomas R. Tephly, Keith F. Tipton, and Daniel W. Nebert. 1997. "The UDP Glycosyltransferase Gene Superfamily: Recommended Nomenclature Update Based on Evolutionary Divergence." *Pharmacogenetics* 7:255–69.
- Marsón, María Elena, Diego Dante Dana, Jaime Altchek, Facundo García-Bournissen, and Guido Mastrantonio. 2013. "Development of UV/HPLC Methods for Quantitative Analysis of Benznidazole in Human Plasma and Urine for Application in Pediatric Clinical Studies." *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 27(5):384–90.
- Martignoni, Marcella, Geny M. M. Groothuis, and Ruben de Kanter. 2006. "Species Differences between Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human CYP-Mediated Drug Metabolism, Inhibition and Induction." *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 2(6):875–94.

- Masana, Monica, Edith G. D. de Toranzo, and Jose A. Castro. 1984. "REDUCTIVE METABOLISM AND ACTIVATION OF BENZNIDAZOLE." *Biochemical Pharmacology* 33(7):1041-45.
- Maya, Juan Diego, Soledad Bollo, Luis J. Nuñez-Vergara, Juan A. Squella, Yolanda Repetto, Antonio Morello, Jacques Périé, and Gérard Chauvière. 2003. "Trypanosoma Cruzi: Effect and Mode of Action of Nitroimidazole and Nitrofurán Derivatives." *Biochemical Pharmacology* 65(6):999-1006.
- Maya, Juan Diego, Bruce K. Cassels, Patricio Iturriaga-vásquez, Jorge Ferreira, Mario Faúndez, Norbel Galanti, Arturo Ferreira, and Antonio Morello. 2007. "Mode of Action of Natural and Synthetic Drugs against Trypanosoma Cruzi and Their Interaction with the Mammalian Host ☆." *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146:601-20.
- Medicos sin Fronteras. 2011. *La Escasez de Benznidazol Deja Sin Tratamiento a Miles de Pacientes de Chagas.*
- Messenger, Louisa A. and Caryn Bern. 2018. "Congenital Chagas Disease: Current Diagnostics, Limitations and Future Perspectives." *Current Opinion in Infectious Diseases* 31(5):415-21.
- Molina, Israel, Fernando Salvador, Adrián Sánchez-Montalvá, M. A. Artaza, R. Moreno, Luísa Perin, A. Esquisabel, Leonardo Pinto, and J. L. Pedraz. 2017. "Pharmacokinetics of Benznidazole in Healthy Volunteers and Implications in Future Clinical Trials." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(4):1-7.
- Morel, Carlos. 1999. "Chagas Disease, from Discovery to Control - and Beyond: History, Myths and Lessons to Take Home." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 94(SUPPL. 1):3-16.
- Morilla, Maria Jose and Eder Lilia Romero. 2015. *Nanomedical*

- Therapeutic and Prophylaxis Strategies Against Intracellular Protozoa in the Americas*. Elsevier Inc.
- Müller Kratz, Jadel, Facundo Garcia Bournissen, Colin J. Forsyth, and Sergio Sosa-Estani. 2018. *Clinical and Pharmacological Profile of Benznidazole for Treatment of Chagas Disease*. Vol. 11. Taylor & Francis.
- Murta, Silvane M. F., Marco A. Krieger, Luciana R. Montenegro, Fernanda F. M. Campos, Christian M. Probst, Andréa R. Ávila, Nair H. Muto, Regina C. D. Oliveira, Luiz R. Nunes, Philippe Nirdé, Oscar Bruna-Romero, Samuel Goldenberg, and Alvaro J. Romanha. 2006. "Deletion of Copies of the Gene Encoding Old Yellow Enzyme (TcOYE), a NAD(P)H Flavin Oxidoreductase, Associates with in Vitro-Induced Benznidazole Resistance in Trypanosoma Cruzi." *Molecular and Biochemical Parasitology* 146(2):151–62.
- de Noya, Belkisyolé Alarcón, Zoraida Díaz-Bello, Cecilia Colmenares, Raiza Ruiz-Guevara, Luciano Mauriello, Arturo Muñoz-Calderón, and Oscar Noya. 2015. "Update on Oral Chagas Disease Outbreaks in Venezuela: Epidemiological, Clinical and Diagnostic Approaches." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 110(3):377–86.
- P.B. Danielson, Bentham Science Publisher. 2005. "The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans." *Current Drug Metabolism* 3(6):561–97.
- Panicucci, R. and R. A. McClelland. 1989. "4,5-Dihydro-4,5-Dihydroxyimidazoles as Products of the Reduction of 2-Nitroimidazoles. HPLC Assay and Demonstration of Equilibrium Transfer of Glyoxal to Guanine." *Canadian Journal of Chemistry* 67(12):2128–35.
- Perdomo, Virginia G., Juan P. Rigalli, Silvina S. M. Villanueva, María L. Ruiz, Marcelo G. Luquita, Claudia G. Echenique, and

- Viviana A. Catania. 2013. "Modulation of Biotransformation Systems and ABC Transporters by Benznidazole in Rats." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(10):4894–4902.
- Pereira, José Borges, Henry Percy Willcox, and José Rodrigues Coura. 1985. "Morbidade Da Doença de Chagas. III. Estudo Longitudinal, de Seis Anos, Em Virgem Da Lapa, Mg, Brasil." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 80(1):63–71.
- Pérez-Molina, José A. and Israel Molina. 2018. "Chagas Disease." *The Lancet* 391(10115):82–94.
- Perez, Catherine J., Alan J. Lymbery, and R. C. Andre. Thompson. 2015. "Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health." *Trends in Parasitology* 31(11):595–603.
- Perin, Luísa, Rodrigo Moreira da Silva, Kátia da Silva Fonseca, Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso, Fernando Augusto Siqueira Mathias, Levi Eduardo Soares Reis, Israel Molina, Rodrigo Correa-Oliveira, Paula Melo de Abreu Vieira, and Cláudia Martins Carneiro. 2017. "Pharmacokinetic and Tissue Distribution of Benznidazole After Oral Administration in Mice." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (February):AAC.02410-16.
- Perin, Luísa, Leonardo Pinto, Glauco Henrique Balthazar Nardotto, Kátia da Silva Fonseca, Beatriz Oliveira Paiva, Thaís Fernanda Rodrigues Bastos Mendes, Israel Molina, Rodrigo Correa-Oliveira, Paula Melo de Abreu Vieira, and Cláudia Martins Carneiro. 2020. "Population Pharmacokinetics and Biodistribution of Benznidazole in Mice." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1–9.
- Pinazo, Maria Jesús, M. Carmen Thomas, Jacqueline Bua, Alina Perrone, Alejandro Gabriel Schijman, Rodolfo Jorge Viotti, Janine M. Ramsey, Isabela Ribeiro, Sergio Sosa-Estani, Manuel Carlos López, and Joaquim Gascon. 2014. "Biological Markers for Evaluating

- Therapeutic Efficacy in Chagas Disease, a Systematic Review.” *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 12(4):479–96.
- Pinho, Rosa T., Mariana C. Waghabi, Fabíola Cardillo, José Mengel, and Paulo R. Z. Antas. 2016. “Scrutinizing the Biomarkers for the Neglected Chagas Disease: How Remarkable!” *Frontiers in Immunology* 7(AUG).
- Puccinelli, Emanuela, Pier Giovanni Gervasi, and Vincenzo Longo. 2011. “Xenobiotic Metabolizing Cytochrome P450 in Pig, a Promising Animal Model.” *Current Drug Metabolism* 12(6):507–25.
- Raaflaub, J. 1980. “Multiple-Dose Kinetics of the Trypanosomicide Benznidazole in Man.”
- Raaflaub, J. and W. H. Ziegler. 1979. “Single-Dose Pharmacokinetics of the Trypanosomicide Benznidazole in Man.” *Arzneimittelforschung* 29(10):1611–14.
- Rajão, Andrade Matheus, Carolina Furtado, Ceres Luciana Alves, Danielle Gomes Passos-silva, Michelle Barbi De Moura, Bruno Luiz Schamber-reis, Marianna Kunrath-lima, Aline Araujo Zuma, João Vieira-da-Rocha, Juliana Borio Ferreira Garcia, Isabela Cecilia Mendes, Sergio Danielo Inho Pena, Andrea Mara Macedo, Regina Gloria Franco, Nadja Cristhina De Souza-pinto, Marisa Helena Gennari de Medeiros, Angela Kaysel Cruz, Cristina Maria Machado Motta, Maria Santuza Ribeiro Teixeira, and Carlos Renato Machado. 2014. “Unveiling Benznidazole ’ s Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in Trypanosoma Cruzi.” *Environmental and Molecular Mutagenesis* 55(309–321).
- Rassi, Anis Jr; Rassi, Anis; 2010. “Chagas Disease.” *The Lancet* 375:1388–1402.
- Richle, R. W. and J. Raaflaub. 1980. “Difference of Effective Antitypanosomal Dosages of Benznidazoles in Mice and Man.

- Chemotherapeutic and Pharmacokinetic Results.” *Acta Tropica* 37:257–61.
- Roberts, J. T. and N. M. Bleehen. 1985. “Benznidazole with CCNU: A Clinical Phase I Toxicity Study.” *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 11(2):331–34.
- Roberts, J. T., N. M. Bleehen, F. Y. F. Lee, P. Workman, and M. I. Walton. 1984. “A PHASE I STUDY OF THE COMBINATION OF BENZNIDAZOLE AND CCNU IN MAN.” (April):24–27.
- Romanha, Alvaro J., Rosana O. Alves, Silvana M. F. Murta, S. Silva, Catherine Ropert, and Ricardo T. Gazzinelli. 2002. “Experimental Chemotherapy against *Trypanosoma Cruzi* Infection : Essential Role of Endogenous Interferon-  $\gamma$  in Mediating Parasitologic Cure.” *The Journal of Infectious Diseases* 186:823–28.
- Sabatini, David D. 2014. “Preparation of Rough Microsomes from Rat Liver.” *Cold Spring Harbor Protocols* 2014(8):845–51.
- Santos da Silva, C., A. L. Carbajal-De-La-Fuente, C. E. Almeida, T. C. M. Gonçalves, and J. Reis Dos Santos-Mallet. 2019. “Morphobiological, Morphometric and Ultrastructural Characterization of Sylvatic *Trypanosoma Cruzi* Isolates from Rio de Janeiro State, Brazil.” *Brazilian Journal of Biology* 79(2):294–303.
- Schijman, Alejandro G., Margarita Bisio, Liliana Orellana, Mariela Sued, Tomás Duffy, Ana M. Mejia Jaramillo, Carolina Cura, Frederic Auter, Vincent Veron, Yvonne Qvarnstrom, Stijn Deborggraeve, Gisely Hajar, Inés Zulantay, Raúl Horacio Lucero, Elsa Velazquez, Tatiana Tellez, Zunilda Sanchez Leon, Lucia Galvão, Debbie Nolder, María Monje Rumi, José E. Levi, Juan D. Ramirez, Pilar Zorrilla, María Flores, Maria I. Jercic, Gladys Crisante, Néstor Añez, Ana M. de Castro, Clara I. Gonzalez, Karla

- Acosta Viana, Pedro Yachelini, Faustino Torrico, Carlos Robello, Patricio Diosque, Omar Triana Chavez, Christine Aznar, Graciela Russomando, Philippe Büscher, Azzedine Assal, Felipe Guhl, Sergio Sosa Estani, Alexandre DaSilva, Constança Britto, Alejandro Luquetti, and Janis Ladzins. 2011. "International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma Cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(1).
- Schofield, Chris J., Jean Jannin, and Roberto Salvatella. 2006. "The Future of Chagas Disease Control." *Trends in Parasitology* 22(12):583–88.
- Sgambatti de Andrade, Ana Lucia S., Fabio Zicker, Renato Mauricio de Oliveira, Simone Almeida e Silva, Alejandro Luquetti, Luiz R. Travassos, Igor C. Almeida, Soraya S. de Andrade, João Guimarães de Andrade, and Celina M. T. Martelli. 1996. "Randomised Trial of Efficacy of Benznidazole in Treatment of Early *Trypanosoma Cruzi* Infection." *The Lancet* 348(9039):1407–13.
- Siemann, Dietmar W., Sharon Morrissey, and Karen Wolf. 1983. "In Vivo Potentiation of 1-(2-Chloroethyl)-3-Cyclohexyl-1-Nitrosourea by the Radiation Sensitizer Benznidazole." *Cancer Research* 43(3):1010–13.
- Silva-dos-Santos, Danielle, Juliana Barreto-de-Albuquerque, Bárbara Guerra, Otacilio C. Moreira, Luiz Ricardo Berbert, Mariana Tavares Ramos, Barbara Angelica S. Mascarenhas, Constança Britto, Alexandre Morrot, Déa M. Serra Villa-Verde, Luciana Ribeiro Garzoni, Wilson Savino, Vinícius Cotta-de-Almeida, and Juliana de Meis. 2017. "Unraveling Chagas Disease Transmission through the Oral Route: Gateways to *Trypanosoma Cruzi* Infection and Target Tissues." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11(4):1–26.

- Skaanild, Mette T. and Christian Friis. 2007. "Is Bupropion a More Specific Substrate for Porcine CYP2E than Chlorzoxazone and P-Nitrophenol?" *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 101(3):159–62.
- Skaanild, Mette Tingleff. 2006. "Porcine Cytochrome P450 and Metabolism." *Current Pharmaceutical Design* 12(11):1421–27.
- Sosa-Estani, Sergio, Elsa Leonor Segura, Andres Mariano Ruiz, Elsa Velazquez, Betina Mabel Porcel, and Cristina Yampotis. 1998. "Efficacy of Chemotherapy with Benznidazole in Children in the Indeterminate Phase of Chagas' Disease." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59(4):526–29.
- Soy, D., E. Aldasoro, L. Guerrero, E. Posada, N. Serret, T. Mejía, J. A. Urbina, and J. Gascón. 2015. "Population Pharmacokinetics of Benznidazole in Adult Patients with Chagas Disease." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(6):3342–49.
- Steverding, Dietmar. 2014. "The History of Chagas Disease." *Parasites and Vectors* 7(1):1–8.
- Strimbu, Kyle and Jorge A. Tavel. 2010. "What Are Biomarkers?" *Current Opinion HIV AIDS* November(5):463–66.
- Thompson, Richard A., Emre M. Isin, Monday O. Ogese, Jerome T. Mettetal, and Dominic P. Williams. 2016. "Reactive Metabolites: Current and Emerging Risk and Hazard Assessments." *Chemical Research in Toxicology* 29(4):505–33.
- Trochine, Andrea, Darren J. Creek, Paula Faral-Tello, Michael P. Barrett, and Carlos Robello. 2014. "Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in Trypanosoma Cruzi Revealed by Metabolomics." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(5):e2844.
- Turnock, Daniel C. and Michael A. J. Ferguson. 2007. "Sugar



- Nucleotide Pools of *Trypanosoma Brucei*, *Trypanosoma Cruzi*, and *Leishmania Major*.” *Eukaryotic Cell* 6(8):1450–63.
- Twentyman, P. R. and P. Workman. 1983. “Chemosensitization by Lipophilic Nitroimidazoles.” *British Journal of Cancer* 48(1):17–26.
- Verbeeck, Roger K. 2008. “Pharmacokinetics and Dosage Adjustment in Patients with Hepatic Dysfunction.” *European Journal of Clinical Pharmacology* 64(12):1147–61.
- Vikingsson, Svante, Jan Olof Dahlberg, Johan Hansson, Veronica Höiom, and Henrik Gréen. 2017. “Simple and Cost-Effective Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method to Measure Dabrafenib Quantitatively and Six Metabolites Semi-Quantitatively in Human Plasma.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409(15):3749–56.
- Villalba, Rafael, Gema Fornés, Miguel A. Alvarez, José Román, Vicente Rubio, Margarita Fernández, J. Manuel García, Monserrat Viñals, and Antonio Torres. 1992. “Acute Chagas’ Disease in a Recipient of a Bone Marrow Transplant in Spain: Case Report.” *Clinical Infectious Diseases* 14(2):594–95.
- Viodé, C. écile, Nadir Bettache, Narimantas Cenas, R. Luise Krauth-Siegel, G. érard Chauvière, Norbert Bakalara, and Jacques Périé. 1999. “Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles.” *Biochemical Pharmacology* 57(5):549–57.
- Viotti, Rodolfo, Carlos Vigliano, Bruno Lococo, Maria Gabriela Alvarez, Marcos Petti, Graciela Bertocchi, and Alejandro Armenti. 2009. “Side Effects of Benznidazole as Treatment in Chronic Chagas Disease : Fears and Realities.” *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 157–63.
- Viotti, Rodolfo, Carlos Vigliano, Bruno Lococo, Graciela Bertocchi, Marcos Petti, Maria Gabriela Alvarez, Miriam Posta, and Alejandro

- Armenti. 2006. “Annals of Internal Medicine Article Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment.” *Annals of Internal Medicine* 144:724–34.
- Walton, Michael I., Norman M. Bleehen, and Paul Workman. 1987. “Heat-Stimulated Nitroreductive Bioactivation of the 2-Nitroimidazole Benznidazole in Vitro.” *Biochemical Pharmacology* 36(16):2627–32.
- Walton, Michael I. and Paul Workman. 1987. “Nitroimidazole Metabolism Quantitation and Characterisation.” 36(6).
- Wendel, Silvano. 2010. “Transfusion Transmitted Chagas Disease: Is It Really under Control?” *Acta Tropica* 115(1–2):28–34.
- WHO World Health Organization. 2018. “WHO | Chagas Disease (American Trypanosomiasis).” *WHO*.
- Wilkinson, Shane R., Christopher Bot, John M. Kelly, and Belinda S. Hall. 2011. “Trypanocidal Activity of Nitroaromatic Prodrugs: Current Treatments and Future Perspectives.” *Current Topics in Medicinal Chemistry* 11(16):2072–84.
- Wilkinson, Shane R. and John M. Kelly. 2012. “Trypanocidal Drugs : Mechanisms , Resistance and New Targets Trypanocidal Drugs : Mechanisms , Resistance and New Targets.” (October 2009).
- Workman, P., M. I. Walton, and F. Y. Lee. 1986. “Benznidazole: Nitroreduction and Inhibition of Cytochrome P-450 in Chemosensitization of Tumour Response to Cytotoxic Drugs.” *Biochemical Pharmacology* 35(1):117–19.
- Zenian, Asadour and Felipe Kierszenbaum. 1983. “Trypanosoma Cruzi: Differences in Cell Surface Interaction of Circulating (Trypomastigote) and Culture (Epimastigote) Forms with Macrophages.” *The Journal of Parasitology* 69(4):660.
- Zhou, Diansong, Jian Guo, Alban J. Linnenbach, Catherine L. Booth-

genthe, and Scott W. Grimm. 2010. "Role of Human UGT2B10 in N-Glucuronidation of Tricyclic Antidepressants, Amitriptyline, Imipramine, Clomipramine and Trimipramine." *Pharmacology* 38(5):863-70.